(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104114179 A
(43)申请公布日 2014.10.22

(21)申请号 201280069595.5

(22)申请日 2012.12.13

(30)优先权数据
61/569,805 2011.12.13 US
61/680,721 2012.08.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.08.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2012/050521 2012.12.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/088440 EN 2013.06.20

(71)申请人 艾玛菲克有限公司
地址 以色列贝尔谢巴

(72)发明人 阿米尔·萨希 阿萨夫·瑟尔特
盖利特·薛泰尔-高德
麦克·丹尼利 欧尔文·梅伦

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 王思琪 郑霞

(51)Int.Cl.
A61K 33/06(2006.01)
A61K 33/10(2006.01)
A61K 35/56(2006.01)
A61P 19/10(2006.01)

权利要求书2页 说明书46页 附图11页

(54)发明名称

用于治疗钙吸收不良和骨代谢紊乱的无定形碳酸钙

(57)摘要

提供了利用施用包含稳定的无定形碳酸钙的组合物，用于治疗钙吸收不良和与钙吸收不良相关的状况的方法。还提供了利用与骨再吸收抑制剂组合施用所述组合物，用于在骨代谢相关的紊乱、疾病或状况中增加骨矿物质密度的方法。

CN 104114179 A

1. 一种在需要治疗钙吸收不良的受试者中治疗钙吸收不良的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 的组合物，所述稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 包含至少一种稳定剂。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述稳定剂选自由以下组成的组 ：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分 ：磷酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。

4. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分 ：磷酸化的氨基酸和多元醇。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述磷酸化的氨基酸以寡肽或多肽存在。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中磷酸化的氨基酸选自磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸。

7. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述稳定剂是选自单糖类、二糖类、三糖类、寡糖类和多糖类的带有羟基的有机化合物。

8. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述稳定剂包括与至少一种碱金属氢氧化物进一步组合的带有羟基的有机化合物。

9. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述稳定剂是羧酸，优选柠檬酸、酒石酸或苹果酸。

10. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述稳定剂包括选自由以下组成的组的至少一种化合物 ：磷酸化的氨基酸、磷酸化的肽、连同至少一种肽的甲壳质、和连同碱性氢氧化物的多元醇。

11. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述 ACC 获自分离的甲壳类动物胃石。

12. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述受试者患有与血浆钙浓度降低至 8.8mg/dL 以下相关的钙代谢的紊乱。

13. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述受试者选自由以下组成的组 ：患有甲状旁腺功能减退症、维生素 D 缺乏、肾小管疾病、肾衰竭、胰腺炎、低蛋白血症、克罗恩氏病、囊性纤维化、炎性肠病、乳糜泻、高磷血症、萎缩性胃炎的患者，肥胖手术或胃手术后的患者，具有增强的骨形成的受试者，以及获得选自包含以下的组的药物的受试者 ：皮质类固醇、质子泵抑制剂、抗惊厥药、利福平和类似抗生素、螯合剂、和抗分泌药。

14. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述受试者容易发生骨矿物质密度损失相关的紊乱、疾病和状况。

15. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述受试者选自绝经后或围绝经期女性。

16. 一种药物组合物，所述药物组合物包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 和选自由以下组成的组的至少一种稳定剂 ：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯、和带有羟基的有机化合物，所述药物组合物用于治疗钙吸收不良。

17. 根据权利要求 16 所述的药物组合物，还包括载体、佐剂、稀释剂或赋形剂。

18. 一种用于在骨代谢相关的紊乱、疾病或状况中增强骨矿物质密度的方法，包括向哺乳类动物受试者施用有效量的包含包含至少一种稳定剂的稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 的组合物。

19. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述稳定剂选自由以下组成的组 ：有机酸、磷酸

羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。

20. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述 ACC 获自分离的甲壳类动物胃石。

21. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述组合物与骨再吸收抑制剂组合施用。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述骨再吸收抑制剂是双膦酸 / 盐 / 酯。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述双膦酸 / 盐 / 酯选自阿仑膦酸 / 盐 / 酯、利塞膦酸 / 盐 / 酯、替鲁膦酸 / 盐 / 酯、伊班膦酸 / 盐 / 酯、唑来膦酸 / 盐 / 酯、帕米膦酸 / 盐 / 酯、依替膦酸 / 盐 / 酯、及其盐和酯。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述双膦酸 / 盐 / 酯是阿仑膦酸 / 盐 / 酯。

25. 根据权利要求 18 和 21 的任一项所述的方法，其中所述骨代谢相关的紊乱、疾病和状况选自骨软化症、骨佩吉特氏病、骨质减少、囊性纤维性骨炎、佝偻病、骨质疏松症和急性酒精摄入。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，其中所述疾病是骨质疏松症。

27. 根据权利要求 25 所述的方法，其中所述所述受试者选自绝经后女性、老年男性、儿童、青少年、孕妇和哺乳期女性。

28. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述受试者选自患有钙吸收不良的患者。

29. 一种药物组合物，所述药物组合物包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC)，所述稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 包含选自由以下组成的组的至少一种稳定剂 ：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物，所述药物组合物用于在骨代谢相关的紊乱、疾病和状况中增强骨矿物质密度。

30. 根据权利要求 29 所述的药物组合物，所述药物组合物用于与骨再吸收抑制剂组合使用。

31. 一种用于在患有钙吸收不良的受试者中增加钙胃肠吸收的方法，包括向所述受试者施用有效量的包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 的组合物，所述稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 包含至少一种稳定剂。

32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中所述受试者选自处于禁食状态和处于进食状态的受试者。

用于治疗钙吸收不良和骨代谢紊乱的无定形碳酸钙

发明领域

[0001] 本发明涉及天然的和合成的无定形碳酸钙的组合物，用于治疗钙吸收不良和吸收不良相关的紊乱、疾病和状况，以及用于在钙吸收不良和骨代谢相关的紊乱中增加骨矿物质密度。

[0002] 背景

[0003] 钙被认为是在人体中最重要的矿物质之一。需要钙来维持骨矿物质密度，钙对神经递质的胞吐作用至关重要，钙参与肌细胞的收缩，钙取代钠作为心脏的去极化矿物，并参与许多其他生理功能。钙的胃肠道吸收，不仅取决于膳食钙的可用性，还取决于肠道的吸收能力，肠道的吸收能力受生理因素诸如钙储备、激素调节或以前膳食钙供给的影响。钙盐（例如碳酸钙）在胃中的溶解是钙作为钙离子（$Ca^{(2+)}$）在近端小肠内的适当的主动和被动吸收的一个步骤。胃酸显著增加难溶性钙盐的溶解和电离。如果不适当分泌酸，钙盐微溶（离子化），并随后可不被适当和有效地吸收。萎缩性胃炎，胃手术，和大剂量、长期使用抗分泌药物显著降低胃酸分泌，并因此，可处于饮食和补充钙的吸收不良的风险状况中，并由此长期可增加骨质疏松症的风险（Sipponen 等人，Scand J Gastroenterol. 2010；45(2):133-8）。

[0004] 钙的胃肠吸收还可在减肥手术后的患者、患有甲状旁腺功能减退症、克罗恩氏病（Crohn's disease）、囊性纤维化、炎性肠病或乳糜泻（celiac disease）的患者中减少。摄入另外类型的药物，诸如质子泵抑制剂、抗惊厥药、及长期皮质类固醇的个体，也可发生钙吸收不良。

[0005] 钙的生物利用度取决于其胃肠道吸收和将吸收的钙掺入到骨中。关于肠道吸收，生理因素，特别是激素，在钙掺入到骨中起主要作用。因此钙的生物利用度可被定义为由肠道潜在可吸收的并可被用于生理机能，特别是骨矿化，或以限制骨损失的膳食钙的比例（Gueguen 等人，J Am Coll Nutr, 2000 卷 19 号 suppl 2 119S-136S）。

[0006] 骨矿物质密度的损失与多种代谢性骨疾病，诸如：骨质减少、骨软化症、佝偻病、囊性纤维性骨炎、和骨质疏松症相关。有研究表明，膳食钙的摄入量不足可诱发许多骨相关疾病，诸如骨质疏松症。

[0007] 用于预防和治疗某些类型的骨质损失（包括骨质疏松症）的标准药物是抗再吸收剂。抗再吸收剂的一个非限制性实例是双膦酸 / 盐 / 酯，例如双膦酸 / 盐 / 酯阿仑膦酸 / 盐 / 酯（ALN）。ALN 的施用减弱骨矿物质密度（BMD）的下降，因为 ALN 具有骨再吸收抑制效应。然而，ALN 还抑制骨形成且其的施用与不良症状的风险相关是公认的问题。组合使用几种药物已被建议用于改善患者的顺应性和治疗效果。

[0008] 如今补充剂中所使用的钙，无论获自天然来源或合成的沉淀物，可包括有机钙盐和无机钙盐两者。在钙的胃肠道吸收有限的特定条件下，可用补充剂的标准摄入不足以促进吸收，导致需要增加摄入的剂量。吸收不良相关状况中摄入更高钙剂量的需求导致像便秘、肾结石、血管问题和随后降低的顺应性的不良作用。此外，大多数钙补充剂要求低胃 pH 以有效地溶解并通过肠道吸收，并因此其生物利用度在禁食状态中较好。

[0009] 在过去的 20 年中，出现了对碳酸钙的热力学不稳定的无定形多形体，命名为无定形碳酸钙 (ACC) 的迅速增加的科学兴趣。在自然界中，ACC 由少数的生物体，主要是发展了用于在瞬时矿物沉积部位中稳定 ACC 能力的甲壳类动物和其他无脊椎动物来利用。这些生物体需要用于钙的周期性松动、吸收和沉淀的特殊有效矿物源。在某些甲壳类动物，诸如淡水螯虾中，ACC 以大量存储于称为胃石的特化的瞬时贮藏器官中。

[0010] 近年来，本发明的一些发明人已公开了，将胃石器官磨碎作为药物和营养药物钙组合物中有用的细粉的用途 (WO 05/115414)。公开了，包含胃石组分的组合物的每日口服摄入显著改善一系列的状况，诸如骨紊乱、骨折、和癌症 (WO 2008/041236)。用于治疗各种紊乱和状况的包含 ACC 和磷酸化的肽或氨基酸的药物和营养药物组合物在 WO 2009/053967 中公开。

[0011] 对于钙吸收不良、钙吸收不良相关的骨密度损失和骨代谢相关疾病的有效治疗存在未满足的需要。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供了使用包括合成的或天然的稳定 ACC 的组合物用于治疗钙吸收不良的方法。本文中第一次公开了，ACC 可克服其他类型的钙补充剂的缺陷，甚至在患有钙吸收不良的患者中的缺陷。

[0014] 此外钙吸收不良的治疗可预防或减少或延缓钙缺乏相关的紊乱、疾病的发作。根据一些实施方案，与钙缺乏相关的状况包括减肥手术或胃手术后的患者，患有甲状旁腺功能减退症、维生素 D 缺乏、肾小管疾病、肾衰竭、胰腺炎、低蛋白血症和高磷血症的患者。根据另外实施方案，涉及钙吸收不良的疾病包括克罗恩氏病、囊性纤维化、炎性肠病、乳糜泻、和特应性胃炎。根据另外的实施方案，钙吸收不良可包括具有增强的骨形成的受试者和摄入皮质类固醇、质子泵抑制剂、抗惊厥药、利福平和类似的抗生素、螯合剂、和抗分泌药的个体。

[0015] 与其他钙补充剂相比，稳定的 ACC 的增强的钙胃肠吸收可延缓或最小化包括绝经后女性和围绝经期女性、老年男性、儿童、青少年、孕妇和哺乳期女性的其他人群中起因于钙缺乏的状况和紊乱。

[0016] ACC 的增强的钙生物利用度还可延缓或最小化患有钙吸收不良的受试者中的骨密度损失。本发明提供了包括合成的或天然的稳定 ACC 的组合物用于在代谢性骨紊乱、疾病和状况的受试者中增加骨矿物质密度的用途。本发明的组合物还被用于所述紊乱、疾病或状况，包括骨软化症、骨佩吉特氏病 (Paget's disease of bone)、骨质减少、囊性纤维性骨炎、佝偻病、骨质疏松症和急性酒精摄入的延缓发生和治疗。

[0017] 在一个方面，本发明提供了在需要治疗钙吸收不良的受试者中治疗钙吸收不良的方法，包括向所述受试者施用有效量的包含至少一种稳定剂的稳定的无定形碳酸钙 (ACC)。根据一些实施方案，ACC 是合成来源的。根据其他实施方案，ACC 是天然来源的。

[0018] 根据一些实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯、带有羟基的有机化合物，及其组合。每个可能性代表了本发明的独立实施方案。在一些实施方案中，所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分：磷酸羟基羧酸酯或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。在一些实施方案中，所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分：磷酸化的氨基酸和多元醇。所述氨基酸可以以氨基酸衍生物或寡肽或多肽

存在，且所述多元醇可包括醇或糖类。每个可能性代表了本发明的独立实施方案。根据一些实施方案，磷酸化的氨基酸选自磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸。根据一些实施方案，所述稳定剂包括选自单糖类、二糖类、寡糖类和多糖类的至少一种糖。根据一些实施方案，所述稳定剂包括与至少一种碱金属氢氧化物进一步组合的带有羟基的有机化合物。根据一些实施方案，稳定剂是羧酸、优选柠檬酸、酒石酸或苹果酸。在一些实施方案中，所述稳定剂包括选自以下的至少一种化合物：磷酸化的氨基酸、磷酸化的肽、连同至少一种肽的甲壳质、和连同碱性氢氧化物的多元醇。根据一些示例性实施方案，所述 ACC 获自分离的甲壳类动物胃石。根据一个实施方案，所述天然 ACC 由甲壳质和多肽来稳定。根据另一个实施方案，ACC 是合成的，其中所述合成的 ACC 由选自磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸的磷酸化的氨基酸来稳定。根据另一个实施方案，所述合成的 ACC 由磷酸丝氨酸与柠檬酸组合来稳定。根据还另一个实施方案，所述合成的 ACC 由柠檬酸来稳定。根据又另一个实施方案，所述 ACC 由蔗糖与氢氧化钠组合来稳定。

[0019] 根据一些实施方案，受试者患有与血浆钙浓度降低至 8.8mg/dL 以下相关的钙代谢的紊乱。根据一些实施方案，需要治疗的受试者选自由以下组成的组：患有甲状旁腺功能减退症、维生素 D 缺乏、肾小管疾病、肾衰竭、胰腺炎、低蛋白血症、克罗恩氏病、囊性纤维化、炎性肠病、乳糜泻、高磷血症、特应性胃炎的患者，肥胖手术或胃手术后的患者，具有增强的骨形成的受试者，以及获得选自包含以下的组的药物的受试者：皮质类固醇、质子泵抑制剂、抗惊厥药、利福平和类似抗生素、螯合剂、和抗分泌药。根据一些实施方案，受试者选自绝经后或围绝经期女性。根据一些实施方案，所述受试者容易发生骨矿物质密度损失相关的紊乱、疾病和状况。需要钙吸收不良治疗的受试者中与骨密度损失相关的紊乱可以是骨质疏松症。

[0020] 在另一个实施方案中，本发明提供了包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 的药物组合物，所述稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 包含选自由以下组成的组的至少一种稳定剂：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物，所述药物组合物用于治疗钙吸收不良。根据本发明的药物组合物还可包含载体、佐剂、稀释剂或赋形剂。

[0021] 在另一个实施方案中，本发明涉及无定形碳酸钙用于治疗钙吸收不良的用途，所述无定形碳酸钙包含选自由以下组成的组的至少一种稳定剂：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。

[0022] 在另一个实施方案中，本发明涉及无定形碳酸钙在制备用于治疗钙吸收不良的药剂中的用途，所述无定形碳酸钙包含选自由以下组成的组的至少一种稳定剂：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。

[0023] 在另一个方面，本发明涉及用于治疗钙吸收不良相关的紊乱、疾病和状况的包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 的组合物，所述稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 包含至少一种稳定剂。

[0024] 本发明还涵盖包含稳定无定形碳酸钙 (ACC) 的组合物在制备用于在钙吸收不良相关紊乱、疾病和状况中治疗（在进食或禁食状态）钙吸收不良的药剂中的用途，其中将 ACC 与至少一种稳定剂精细混合。在一个实施方案中，当在进食状态施用时，包含稳定 ACC 的组合物具有优良的胃肠吸收。在另一个实施方案中，当在禁食状态施用时，包含稳定 ACC 的组合物具有优良的胃肠吸收。

[0025] 在另一个方面，本发明提供了用于在骨代谢相关的紊乱、疾病或状况中增强骨矿物质密度的方法，包括向哺乳类动物受试者施用有效量的包含包含稳定的无定形碳酸钙(ACC)和至少一种稳定剂的组合物。根据一些实施方案，ACC是合成来源的。根据其他实施方案，ACC是天然来源的。根据一些实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯、带有羟基的有机化合物，及其组合。每个可能性代表了本发明的独立实施方案。在一些实施方案中，所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分：磷酸羟基羧酸酯或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。在一些实施方案中，所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分：磷酸化的氨基酸和多元醇。所述氨基酸可以以氨基酸衍生物或寡肽或多肽存在，且所述多元醇可包括醇或糖类。每个可能性代表了本发明的独立实施方案。根据一些实施方案，磷酸化的氨基酸选自磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸。根据一些实施方案，所述稳定剂包括选自单糖类、二糖类、寡糖类和多糖类的至少一种糖。根据一些实施方案，所述稳定剂包括与至少一种碱金属氢氧化物进一步组合的带有羟基的有机化合物。根据一些实施方案，稳定剂是羧酸、优选柠檬酸、酒石酸或苹果酸。在一些实施方案中，所述稳定剂包括选自以下的至少一种化合物：磷酸化的氨基酸、磷酸化的肽、连同至少一种肽的甲壳质、和连同碱性氢氧化物的多元醇。根据一些示例性实施方案，所述ACC获自分离的甲壳类动物胃石。

[0026] 根据一些实施方案，用于增强骨矿物质密度的方法包括施用包含与骨再吸收抑制剂组合的稳定的ACC的组合物。根据一些实施方案，骨再吸收抑制剂是双膦酸/盐/酯(bisphosphonate)。根据一些实施方案，双膦酸/盐/酯选自阿仑膦酸/盐/酯、利塞膦酸/盐/酯、替鲁膦酸/盐/酯、伊班膦酸/盐/酯、唑来膦酸/盐/酯、帕米膦酸/盐/酯、依替膦酸/盐/酯、及其盐和酯。根据一个实施方案，双膦酸/盐/酯是阿仑膦酸/盐/酯。根据一些实施方案，与没有钙补充剂或以稳定的ACC补充剂以外的钙补充剂需要的剂量相比，组合物与较低治疗剂量的双膦酸/盐/酯阿仑膦酸/盐/酯组合施用。根据一些实施方案，本发明提供了用于在选自以下的骨代谢相关紊乱、疾病或状况中增强骨矿物质密度的方法：骨质疏松症、骨软化症、骨佩吉特氏病、骨质减少、囊性纤维性骨炎和佝偻病。在一个特定的实施方案中，本发明提供了用于在骨质疏松症中增强骨矿物质密度的方法。根据一些实施方案，本发明提供了用于在选自以下的骨代谢相关紊乱、疾病或状况中增强骨矿物质密度的方法：骨软化症、骨佩吉特氏病、骨质减少、囊性纤维性骨炎、佝偻病、骨质疏松症和急性酒精摄入，该方法包括与骨再吸收抑制剂组合施用所述组合物。在一个特定的实施方案中，本发明提供了用于在骨质疏松症中增强骨矿物质密度的方法，该方法包括与双膦酸/盐/酯阿仑膦酸/盐/酯组合施用所述组合物。根据本发明的方法，向选自以下的哺乳动物类受试者施用组合物：绝经后女性、老年男性、儿童、青少年、孕妇和哺乳期女性。根据一些实施方案，用于增强骨矿物质密度的方法包括施用包含稳定的ACC的组合物，其中所述受试者选自患有钙吸收不良和钙吸收不良相关紊乱、疾病和状况的患者。

[0027] 本发明还提供了包含稳定的无定形碳酸钙(ACC)的组合物在制备用于在骨代谢相关紊乱、疾病或状况中增强骨矿物质密度的药剂中的用途，所述稳定的无定形碳酸钙(ACC)包含选自由以下组成的组的至少一种稳定剂：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。根据本发明的药物组合物还可包含载体、佐剂、稀释剂或赋形剂。

[0028] 在还另一个方面，本发明提供了在患有钙吸收不良的受试者中增强钙胃肠吸收的方法，包括向所述受试者施用有效量的包含至少一种稳定剂的 ACC。根据一些实施方案，向选自处于禁食状态和处于进食状态的受试者的所述受试者进行施用。

[0029] 本发明的所有上述和其他特征和优点将通过其实施方案的以下说明性和非限制性描述，并参考附图来进一步理解。

[0030] 附图简述

[0031] 图 1 ：与结晶碳酸钙比较，向大鼠施用无定形碳酸钙 (ACC) 后提高了钙水平

[0032] 结果是平均值 ±SEM。学生 t- 检验 (Student’s t-test) ：*p<0.05

[0033] 图 2 ：在进食的绝经后女性中，与结晶碳酸钙 (CCC) 比较，无定形碳酸钙 (ACC) 施用后的钙吸收比例增加了 2.1 倍 / 女性

[0034] 配对 t- 检验 ：p<0.01

[0035] 图 3 ：在进食的绝经后女性中，当分析两个分离的组时，与结晶碳酸钙 (CCC) 比较，无定形碳酸钙 (ACC) 施用后的钙吸收比例增加了 1.9 倍

[0036] 结果是平均值 ±SEM。学生 t- 检验 ：*p<0.05

[0037] 图 4 ：在一个禁食的绝经后女性中，与结晶碳酸钙 (CCC) 比较，无定形碳酸钙 (ACC) 施用后的钙吸收比例增加了 4.6 倍

[0038] 图 5A-5E ：来自每个处理组的代表性股骨远端和第 4 椎骨横截面的三维重建。

[0039] 用于以下的结节状骨区 (Tubercular bone region) ：假处理 (Sham)(图 5A) ；结晶碳酸钙 (CCC)(图 5B) ；无定形碳酸钙 (ACC)(图 5C) ；CCC+ 阿仑膦酸盐 (ALN)(图 5D) ；和 ACC+ALN(图 5E)。比例尺表示 1.5mm 距离。

[0040] 图 6A-6D ：由 μCT 得到的各组的小梁骨矿物质密度 (Tb.BMD) 和来自总骨组织体积的骨体积 (BV/TV)。

[0041] 图 6A ：股骨远端的 Tb.BMD。

[0042] 图 6B ：第 4 腰椎的 Tb.BMD。

[0043] 图 6C ：股骨远端的 BV/TV。

[0044] 图 6D ：第 4 腰椎的 BV/TV。

[0045] 百分比表示从 CCC 处理的组 (对照) 的增加。

[0046] 图 7A-7E ：来自每个处理组的代表性股骨远端和第 4 脊椎横截面的三维重建。

[0047] 用于以下的结节状骨区 ：假处理 (图 7A) ；对照 (图 7B) ；胃石 (Gast)(图 7C) ；无定形碳酸钙 (ACC)(图 7D) ；和柠檬酸盐 (图 7E)。比例尺表示 1.5mm 距离。

[0048] 图 8A-8B ：由 μCT 得到的各组的小梁骨矿物质密度 (Tr.BMD)。

[0049] 图 8A ：股骨远端的 Tr.BMD。

[0050] 图 8B ：第 4 腰椎的 Tr.BMD。

[0051] 单因素 ANOVA:p<0.001。字母表示 Fishers LSD 事后比较。

[0052] 图 9A-9B ：由 μCT 得到的各处理组的来自总骨组织的小梁骨体积 (BV/TV)。

[0053] 图 9A ：股骨远端的 BV/TV。

[0054] 图 9B ：第 4 腰椎的 BV/TV。

[0055] 单因素 ANOVA:p<0.001。字母表示 Fishers LSD 事后比较。

[0056] 图 10A-10G ：腰椎的力学微结构性质。

[0057] 极限承载力(图10A);极限承载力的能量(UF)(图10B);韧性(图10C);屈服能量(Energy to yield)(图10D);骨小梁模式因子(TBPf)(Trabecular Bone Pattern factor)(图10E);结构模型指数(SMI)(图10F);各向异性度(DA)(图10G)。

[0058] 单因素ANOVA:$p<0.01$。字母表示Fishers LSD事后比较。棒表示SEM。

[0059] 发明详述

[0060] 本发明公开了包含稳定的无定形碳酸钙(ACC)的组合物的以前未知的用途。发现,相比于通常市售的钙补充剂,根据本发明的基于无定形碳酸钙的组合物是优良钙源。现已发现,包含ACC的组合物具有令人惊奇地高的钙生物利用度,包括在胃肠道和骨中更高的吸收能力。因此,ACC的使用有益于钙吸收不良相关的紊乱、疾病和状况(进食和禁食状态两者,甚至在禁食状态下更大的优势)和骨损失相关的紊乱和状况。

[0061] 如本文所用的术语"治疗",是指施用ACC并增强钙在胃肠道和骨中的吸收。

[0062] 如本文所用的术语"延缓发生"或"预防"是指延缓骨疾病的发展,延缓症状的发展和/或降低将要或预期发展的此类症状的严重程度。

[0063] 术语"稳定的ACC"在本文中用以指示碳酸钙长时间段被保持在无定形状态,例如,从数周至数年,经所述时间段不超过5%转化成结晶形式。根据本发明,ACC的结晶通过添加选自以下的一种或更多种稳定剂来抑制:有机或无机成分,诸如磷酸化的氨基酸,其他有机酸、肽类、盐类、糖类、或脂类。所述盐可包括,例如,选自镁、钾、锶、和钠的阳离子,和选自碳酸盐、磷酸盐、硫酸盐、氯化物、溴化物、氟化物、柠檬酸盐、延胡索酸盐、苹果酸盐或其他有机阴离子的阴离子;术语阴离子和阳离子被用于仅仅描述盐的组成,并不暗示有关所述分子的溶解度或pH的任何事。

[0064] 如本文所用的术语"稳定剂(stabilizer)"或"稳定剂(stabilizing agent)"可互换使用,并且是指保持碳酸钙在无定形状态的任何物质。

[0065] 如本文所用的术语"钙吸收不良"是指膳食钙跨胃肠道的吸收异常。如本文所用的术语"骨损失"是指在受试者中骨细胞或组织的任何减少、骨量的减少、骨矿物质的减少、或骨矿物质密度的减少。

[0066] 如本文所用的术语"有效量"是指包含稳定的ACC的组合物以治疗钙吸收不良、钙吸收不良和矿物质骨密度相关的疾病、紊乱和状况,并以适用于任何医学或营养治疗的合理利益/风险比率提高矿物质骨密度的足够量。

[0067] 在一个实施方案中,本发明提供了包含稳定的ACC和足以维持ACC在无定形状态的量的稳定剂的合成的(人工的)组合物。稳定剂选自,但不限于,有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。根据一些实施方案,所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分:磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯,诸如磷酸烯醇丙酮酸、磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、硫酸丝氨酸(sulfoserine)或硫酸苏氨酸(sulfothreonine)和选自单糖类、二糖类、三糖类、寡糖类和多糖类,例如蔗糖、甘露糖、葡萄糖的带有羟基的有机化合物。包含带有羟基的有机化合物的稳定剂可还包含至少一种碱金属氢氧化物,诸如氢氧化钠、氢氧化钾和类似的氢氧化物。在本发明的一些实施方案中,所述稳定剂选自磷酸化的氨基酸和多元醇。磷酸化的酸可以以寡肽和多肽存在。在本发明的其他实施方案中,稳定剂是有机酸、优选羧酸。羧酸优选地选自柠檬酸、酒石酸或苹果酸。

[0068] 在本发明的一个实施方案中,ACC由磷酸丝氨酸(P-Ser)或磷酸苏氨酸(P-Thr)来

稳定。在另一个实施方案中，稳定的 ACC 包括蔗糖和氢氧化钠的组合。在本发明的还另一个实施方案中，ACC 由柠檬酸来稳定。在本发明的又另一个实施方案中，ACC 由磷酸丝氨酸和柠檬酸的组合来稳定。在本发明的优选的实施方案中，将包含包含痕量的一种或更多种稳定剂的稳定的 ACC 的人工组合物施用至需要增加或改进钙吸收的人。

[0069] 在另一个实施方案中，本发明提供了包含以分离的螯虾胃石存在的稳定的 ACC 的天然组合物。磨碎的胃石包括 ACC、主要由甲壳质和多肽组成的有机物质、和盐。有机物质中存在的组分稳定 ACC 并阻止其结晶。

[0070] 在一个方面，本发明提出的高钙生物利用度与稳定分子不相关。在另一个方面，本发明要求保护，高钙生物利用度仅与碳酸钙的无定形状态相关。

[0071] 在另一个方面，本发明提供了用于治疗患有钙吸收不良和钙吸收不良相关的紊乱、疾病和状况的患者中的钙吸收不良的组合物，所述组合物包含稳定的 ACC，所述稳定的 ACC 包含至少一种稳定剂。在另一个方面，提供了用于在患有钙吸收不良的受试者中增强钙胃肠吸收的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含稳定的无定形碳酸钙的组合物，所述稳定的无定形碳酸钙包含至少一种稳定剂。

[0072] 根据一些实施方案，与钙缺乏相关的状况包括肥胖手术或胃手术后的患者，患有甲状旁腺功能减退症、维生素 D 缺乏、肾小管疾病、肾衰竭、胰腺炎、低蛋白血症、和高磷血症的患者。根据另外的实施方案，涉及钙吸收不良的疾病包括克罗恩氏病、囊性纤维化、炎性肠病、乳糜泻、和特应性胃炎。根据另外的实施方案，钙吸收不良可包含具有增强的骨形成的受试者和摄入皮质类固醇、质子泵抑制剂、抗惊厥药、利福平和类似的抗生素、螯合剂、和抗分泌药物的个体。

[0073] 降低的钙胃肠吸收还可导致骨矿物质密度损失。在另一个方面，本发明提供了用于在患有钙吸收不良相关的紊乱、疾病和状况的患者中增加矿物质骨密度的组合物，所述组合物包含稳定的 ACC，所述稳定的 ACC 包含至少一种稳定剂。本发明还提供了用于在患有钙吸收不良的受试者中治疗骨密度损失的组合物，所述组合物包含稳定的 ACC，所述稳定的 ACC 包含至少一种稳定剂。与其他钙补充剂相比，稳定的 ACC 的增强的钙胃肠吸收可在包括绝经后女性和围绝经期女性、老年男性、儿童、青少年、孕妇和哺乳期女性的人群中延缓或最小化起因于钙缺乏的状况和紊乱。

[0074] 在又另一个方面，本发明提供了用于在骨代谢相关的紊乱、疾病和状况中增强骨矿物质密度的组合物，所述组合物包含稳定的 ACC，所述稳定的 ACC 包含至少一种稳定剂。根据本发明的一个实施方案，骨代谢相关的紊乱、疾病和状况选自：骨软化症、骨佩吉特氏病、骨质减少、囊性纤维性骨炎、佝偻病、骨质疏松症和急性酒精摄入。根据一些实施方案，所述组合物可与用于预防和治疗骨损失的其他药剂组合施用。预防和治疗骨损失的药剂选自骨再吸收抑制剂，包括双膦酸 / 盐 / 酯（双膦酸的盐）、雌激素受体调节剂、雄激素受体调节剂、降钙素制品、α - 降钙素基因相关肽制品、依普黄酮制品、促蛋白合成类固醇制品、抗 RANKL(NF-κB 配体的受体活化剂）抗体以及类似物。用于预防或治疗骨矿物质密度损失的双膦酸 / 盐 / 酯的一个非限制性实例是双膦酸 / 盐 / 酯阿仑膦酸 / 盐 / 酯。包含 ACC 的组合物与骨再吸收抑制剂的组合使用提供了对增加骨矿物质密度的累加效应。不希望受任何特定理论的束缚，由 ACC 提供的累加效应可归因于高生物利用度及其诱导骨形成的效应。与 ALN 与结晶碳酸钙组合施用相比，由于观察到的累加效应，ACC 与骨再吸收抑制剂组

合施用允许降低骨再吸收抑制剂的治疗剂量。在一些实施方案中，本发明提供了用于在骨代谢相关的紊乱中增强骨矿物质密度的方法，包括施用与双膦酸 / 盐 / 酯组合的包含稳定的 ACC 的组合物，所述稳定的 ACC 包含至少一种稳定剂。在本发明的上下文中，术语组合治疗包括以单一剂量形式或单独的剂量形式施用两种或更多种活性成分。单独的剂量形式可同时地或顺序地或完全独立地用单独的治疗方案来施用。例如，ACC 可每日施用，而双膦酸 / 盐 / 酯可较不频繁地施用。

[0075] 在一些实施方案中，与没有钙补充剂或以稳定的 ACC 补充剂以外的钙补充剂需要的剂量相比，所述组合物与较低治疗剂量的双膦酸 / 盐 / 酯组合施用。在一些实施方案中，双膦酸 / 盐 / 酯是阿仑膦酸 / 盐 / 酯。在一些实施方案中，与没有钙补充剂或以稳定的 ACC 补充剂以外的钙补充剂需要的剂量相比，所述组合物与较低治疗剂量的阿仑膦酸 / 盐 / 酯组合施用。在一些实施方案中，与 ALN 组合的所述组合物被用于在骨质疏松症中增强骨矿物质密度。

[0076] 在又另一个方面，本发明提供了用于治疗骨矿物质密度损失相关的紊乱的组合物，所述组合物包含稳定的 ACC，所述稳定的 ACC 包含至少一种稳定剂。根据本发明的一个实施方案，骨矿物质密度损失相关的紊乱、疾病和状况选自骨软化症、骨质减少、囊性纤维性骨炎、佝偻病、骨质疏松症和急性酒精摄入。

[0077] 在还另一个方面，本发明提供了用于骨矿物质密度损失相关的紊乱的延缓发生或预防的组合物，所述组合物包含稳定的 ACC，所述稳定的 ACC 包含至少一种稳定剂。根据本发明的一个实施方案，骨矿物质密度损失相关的紊乱、疾病和状况选自骨软化症、骨质减少、囊性纤维性骨炎、佝偻病、骨质疏松症和急性酒精摄入。

[0078] 根据本发明的方法，包含稳定的 ACC 的组合物用于在易感骨矿物质密度减少或发生骨代谢相关紊乱的受试者，诸如绝经后女性和老年男性中的使用是特别有利的。在另一个方面，本发明的组合物向需要摄入高水平钙的受试者诸如儿童、青少年及在怀孕和哺乳期的女性施用。在又一个方面，本发明的组合物向患有钙吸收不良的受试者施用。

[0079] 在一个方面，本发明涉及包含稳定的 ACC 的组合物在制备用于在患有钙吸收不良相关的紊乱、疾病和状况的患者中治疗钙吸收不良的药剂中的用途，所述稳定的 ACC 包含至少一种稳定剂。

[0080] 在还另外的方面，本发明涉及包含稳定的 ACC 的组合物在制备用于在骨代谢相关紊乱、疾病或状况中增强骨矿物质密度的药剂中的用途，所述稳定的 ACC 包含至少一种稳定剂。在一些实施方案中，所述药剂与骨再吸收抑制剂组合使用。在又另外的方面，所述组合物用于制备用于治疗骨矿物质密度损失相关的疾病、紊乱和状况的药剂。在还另外的方面，本发明涉及包含 ACC 的组合物在制备用于预防骨矿物质密度损失相关疾病、紊乱和状况和钙吸收不良相关的状况的药剂中的用途。在还另外的方面，本发明的组合物被用于在容易发生代谢性骨紊乱、疾病和状况的人群中增加钙吸收。在一个实施方案中，本发明涉及口服施用包含稳定的 ACC 的组合物，所述组合物当在进食状态下施用时，具有优良胃肠生物利用度。在另一个实施方案中，本发明涉及在禁食状态下口服施用包含稳定 ACC 的组合物，以达到更有效的胃肠生物利用度。

[0081] 已提供支持以下概念的证据 ：作为 ACC 施用时，不管稳定分子或机制，无定形碳酸钙单独促进钙的较高生物利用度。在本发明的一个重要的实施方案中，当在进食状态下施

用时，合成的ACC具有优良的胃肠生物利用度。在本发明的另一个重要的实施方案中，当在禁食状态下施用时，合成的ACC具有优良的胃生物利用度。在本发明的还其他重要的实施方案中，当在进食状态下施用时，来自天然来源的ACC具有优良的胃生物利用度。在本发明的另外重要的实施方案中，当在禁食状态下施用时，来自天然来源的ACC具有优良的胃生物利用度。根据一些实施方案，无论受试者是否处于禁食状态或进食状态下，向需要此治疗的受试者进行施用包含至少一种稳定剂的稳定ACC。

[0082] 本发明的组合物可以优选地以各种口服形式口服施用，所述口服形式包括，但不限于，片剂、胶囊、丸剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、酊剂、混悬剂、糖浆剂、乳剂和凝胶形式。

[0083] 在口服施用是以片剂或胶囊的形式的情况下，组合物组分可与无毒的药学上可接受的惰性载体或赋形剂诸如乳糖、淀粉、蔗糖、葡萄糖、改性的糖、改性淀粉、甲基纤维素及其衍生物、甘露糖醇、山梨糖醇、和其他还原性和非还原性糖、硬脂酸镁、硬脂酸、硬脂酰富马酸钠、山嵛酸甘油酯、无定形硅胶或其他干燥剂材料以及类似物组合。

[0084] 本发明的组合物可以以从0.5g至约5g的每日剂量施用。根据另外的实施方案，本发明的组合物可以以从1.5g至约20g的每日剂量施用。本发明的组合物可以以包含从0.15g至约1.5g的范围的元素钙的每日剂量施用。根据另外的实施方案，本发明的组合物可以通常以包含从0.5g至约6g的范围的元素钙的每日剂量施用。

[0085] 对于以液体形式口服施用，组合物组分可以与无毒的药学上可接受的惰性载体诸如乙醇、甘油、水以及类似物组合。当希望或需要时，还可将适合的粘合剂、润滑剂、崩解剂和着色剂和调味剂掺入至混合物中。

[0086] 根据本发明的组合物的特殊益处是其被证实对于口服施用的低毒性和高安全性。因此，在本发明的其他方面，本发明的组合物有利地用作医疗食品。

[0087] 本发明人进行了旨在评估包含稳定的ACC的钙源的生物利用度的实验。来自ACC的钙的生物利用度，以钙胃肠吸收和对骨矿化过程的钙可用性（骨吸收性）两种方式来评估。评估了一般健康人群和患有或易患钙吸收不良的人群中的钙胃肠吸收。降低的钙胃肠吸收是骨密度损失的原因之一。因此，还评估了患有钙吸收不良的人群中的钙骨吸收性。使用稳定的ACC可有益于在患有或易患钙吸收不良的受试者中提高钙胃肠吸收和增加骨矿物质密度。还评估了在易患骨损失相关的紊乱和状况的人群，例如绝经后的女性中的钙胃肠吸收。

[0088] 发现对骨矿化过程的增强的钙可用性增加骨矿物质密度并积极影响其他骨参数。如下文例证，评估了包含不同稳定剂的稳定的ACC对各种骨参数的效应。还评估了骨质疏松大鼠模型中ACC对骨矿物质密度和其他骨参数的效应。基于无定形碳酸钙的组合物还与骨抗再吸收的药剂，诸如阿仑膦酸／盐／酯双膦酸／盐／酯组合，并评价了它们对骨比例(bone fraction)参数的相互效应。

[0089] 生物利用度测量包括基于用于评估各种药物和补充剂的广泛报道的生物利用度模型，通过血清和尿取样评估胃肠道中来自稳定的ACC源的钙吸收，并基于用于评估各种药物和补充剂的广泛报道的骨质疏松预防和治疗模型，评估来自稳定的ACC源的钙对骨矿物质密度和其他骨参数的效应。在患有吸收不良的患者，例如患有甲状旁腺功能减退症的患者和摄入皮质类固醇的个体以及患有骨矿物质密度相关紊乱的人群中评估了稳定的ACC的生物利用度。来自ACC源的钙的增强的生物利用度允许单独或与用于治疗骨损失的标准

药剂组合使用 ACC 用于治疗和预防各种钙吸收不良和代谢性骨相关的疾病、病患和状况。现已一般性地描述了本发明，通过参考通过说明来提供并非意在限制本发明的以下实施例将更容易地理解本发明。

实施例

[0090] 试验 1 ：来自 ACC 源的钙的胃肠吸收。

[0091] 本实验的目的是在大鼠放射性同位素标记模型中评价包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 的钙源的胃肠吸收。

[0092] 使二十六只 2 月龄雄性 Wistar 大鼠，体重 240±15g，口服施用包含本质上以 ^{45}Ca 标记的 ACC（无定形碳酸钙）或 CCC（结晶碳酸钙）的单一明胶胶囊，随后测量血清中的钙吸收比例以及钙排泄。

[0093] 图 1 呈现血清钙浓度的变化，如通过对施用的剂量标准化放射性读数来计算的。接受 ACC 的大鼠中的 C_{max} 值比 CCC 组中的那些 C_{max} 值显著更高（高达 40％）（图 1 和表 1）。

[0094] 表 1 ：口服施用放射性碳酸钙制剂后血清中钙的药代动力学参数

[0095]

化合物	C_{max}（μg/mL）	T_{max}（h）	AUC_{∞}（μg×h/mL）
CCC	5.8±0.07[a]	3.0±0.3[a]	109.7±6.4[a]
ACC	8.1±0.8[b]	2.8±0.2[a]	134.5±7.0[b]

[0096] 不同上标字母代表统计学显著 ($p<0.05$)，如通过 ANOVA 确定的

[0097] 药代动力学分析表明，ACC 的胃肠道吸收比 CCC 的胃肠道吸收显著更高（曲线下面积，AUC 值分别高 22.5％、和 20％，$P<0.05$），而达到最大浓度所需的时间 (T_{max}) 在组之间没有显著差异（表 1）。

[0098] 在图 1 中呈现的保留值表明，接受包含 CCC 的胶囊的大鼠保留所接受的剂量的 48.5±1.3％。另一方面，接受 ACC 胶囊的大鼠分别保留所接受的剂量的 61.4±2.0％和 60.6±2.1％。与 CCC 处理的组的保留相比，这相应于保留显著增加了 26.6％ ($p<0.05$)。

[0099] 实验细节

[0100] 动物

[0101] 所有的动物都根据 the Israel Animal Welfare Act 在 the Ben-Gurion University Animal Care and Use program 的监督下来处理。五十一只二月龄雄性 Wistar 大鼠 (Harlan-Teklad, Jerusalem, Israel)，体重 240±15g，随机安置在控制环境的房间中的不锈钢笼内 (23℃温度，12:12h 光 :暗周期）。将大鼠随意喂食营养物质足够的实验室大鼠饲料颗粒 (Koffolk, Petah-Tikva, Israel)，并自由饮水 48h。在实验开始前四天，将正常饮食换成了包含 0.24±0.05％钙的低钙饮食 (0.675±0.05％磷酸盐），具体地通过将分别含有 0.01％钙 (0.3％磷酸盐 ;Harlan-Teklad) 和 1％钙 (0.8％磷酸盐 ;Koffolk) 的两种类型食物混合来制备。将两种类型食物分别在研磨机中磨碎，以产生 2 种粉末，将其分别以 4:1 的比例干混合直到细均质化。将均质化的粉末挤压，以形成新的食物颗粒。

[0102] 胶囊施用前十七小时，将大鼠称重，并取血液样品（基线）。然后将大鼠放入单独

的代谢笼中，并剥夺食物和水，直到胶囊施用后 3 小时。给药后三和 24 小时，将～ 10g 低钙食物颗粒 (0.01％钙 ;Harlan-Teklad) 分别给予各大鼠。胶囊施用后 3 小时，蒸馏水被允许开始自由采食。

[0103] 向动物施用明胶胶囊

[0104] 用以丙二醇 (Biolab)1:4(v:v) 稀释的异氟烷 (Minrad) 轻度镇静每只大鼠 30 秒。使用不锈钢大鼠施用注射器 (Harvard Apparatus) 向各实验大鼠用灌胃法施用包含特定的碳酸钙制剂 (即 CCC、ACC 或 ACC-C ;对于每组 n ＝ 17) 的单一胶囊。

[0105] 动物血液取样和化学分析

[0106] 胶囊施用 (时间 0) 前 17h 和施用后 2、3、6、10、24 和 34h，从每只大鼠的尾静脉取 120-150μl 血液样品。使用台式离心机 (Hettich Zentrifugen,Bach,Switzerland) 以 3000g 将血液样品立即离心 10 分钟。将上清液血清的重复样品 (30μl) 转移到包含闪烁液 (Zinsser Analytic,Berkshire,UK) 的塑料瓶中，并使用液体闪烁计数器 (Tri-Carb 2100TR，PerkinElmer,Boston,MA) 测量放射性。根据每只大鼠接受的测量的放射性和具体的放射剂量将来自给定剂量的血浆放射性标准化 [(血清 cpm×100)/(总 cpm× 样品体积)]。

[0107] 动物粪便和尿液取样和分析)

[0108] 在顺应阶段的 17h 饥饿阶段期间 (基线) 和实验的整个 34h 期间收集粪便和尿液以评估钙。将尿液的样品 (500μL) 转移至装有闪烁液的塑料小瓶中。将粪便在 70℃的烘箱中干燥过夜。将样品在研钵中粉碎，直至细均质化。将粪便样品 (200mg) 放入到 5ml 的 1N NaOH 溶液 (Gadot,Netanya,Israel) 中，80℃下温育 3 小时，并以 3600g 离心 10 分钟。将上清液的两份重复样品 (30μL) 转移到包含闪烁液的塑料瓶中。使用液体闪烁计数器测量尿液和粪便样品的放射性。保留值通过减去来自给定剂量的粪便和尿液中测量的放射性来计算 [(摄入量 - 粪便和尿液排泄物)/(摄入量 ×100％)]。

[0109] 动物样品的药代动力学计算

[0110] 使用 WinNonlin 5.2 软件 (Pharsight,Mountain View,CA) 进行了单个大鼠的钙浓度对时间数据的非房室模型分析 (non-compartmental analysis)。

[0111] 统计分析

[0112] 使用 Statistica 6.1 软件 (StaSoft,Tulsa,OK) 对保留值、药代动力学结果和溶解性结果进行单因素方差分析 (ANOVA) 分析。

[0113] 使用 Prism 5 软件进行配对 t- 检验和学生 t 检验。

[0114] p 值 <0.05 被认为是显著。

[0115] 上述试验的结果证实，在动物模型中，稳定的 ACC 比 CCC 具有较高的胃肠吸收。

[0116] 试验 2 ：甲状旁腺功能减退症中的胃肠钙吸收

[0117] 进行了旨在评估包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 的钙源在治疗钙吸收不良中的胃肠生物利用度的实验。进行随机化、两阶段、适应性然后交叉开放标签的研究 (a randomized,two phase,adaptive then crossover open-label,study)，在原发性甲状旁腺功能减退症的管理中将无定形碳酸钙 (ACC) 补充剂与市售的结晶钙补充剂 (CCS) 比较。

[0118] 试验的第一阶段的主要目的是以下概念的证明，与结晶钙补充剂 (CCS) 相比，用较小剂量的来自 ACC 的元素钙的治疗可维持目标血清钙 (对白蛋白修正) 值 (7.0-10.0mg/

dL)。在第一阶段的第二个目的是评估足够的 ACC 剂量。进一步的次要目的是确定食物对 ACC 吸收的效应。

[0119] 试验的第二阶段的主要目的是检验以下假设：与 CCS 相比，用较小剂量的来自 ACC 的元素钙的治疗可维持目标血清钙（对白蛋白修正）值 (7.0-10.0mg/dL)。在第一阶段的第二个目的是检验以下假设：与 CCS 相比，用较小剂量的来自 ACC 的元素钙的治疗不引起患有甲状旁腺功能减退症的受试者中高钙尿症的增加。进一步的次要目的是检验以下假设：与 CCS 相比，用较小剂量的来自 ACC 的元素钙的治疗降低与高钙摄入相关的副作用。

[0120] 选择研究人群

[0121] 研究人群包括二十 (20) 名患有原发性甲状旁腺功能减退症的受试者，每个阶段 10 名受试者。

[0122] 实验产品

[0123] 本研究中使用的稳定的无定形碳酸钙是由 Amorphical Ltd. 提供的被低浓度磷酸丝氨酸和柠檬酸盐（在最终产品中小于 0.5％）稳定的合成的 ACC。磷酸化的丝氨酸和有机柠檬酸是无毒的、自然界中丰富的，并甚至作为独立的膳食补充剂摄入，口服时无报道的不良作用。

[0124] 表 2 总结了根据碳酸钙的美国药典参数评估的 ACC 化学分析，使用电感耦合等离子体原子发射光谱 (ICP-AE)、紫外线 (UV) 光谱，烧失量 (LOI) 和火焰光度计。除非另有规定，测量值的精确度为 ±10％。

[0125] 表 2：Amorphical ACC 的化学分析。

[0126]

分析	USP 要求	ACC 分析结果
烧失量 (LOI)	N/A	14.8％
乙醇残留量	N/A	0.034％
酸不溶性	小于 0.2％	小于 0.0002％
钙	N/A	32.5％
氯化物	N/A	1.36％
钠	N/A	1.85％
磷	N/A	0.143％
硫	N/A	<0.1％
铁	小于 1,000ppm	9.5ppm
碱金属 *	小于 10,000ppm	475ppm

钡 **	通过燃烧测试	20ppm
汞	小于 0.5ppm	小于 1ppm***
氟化物	小于 0.005%	0.001%
铅	小于 3ppm	小于 5ppm***
重金属	小于 0.002%	痕量（小于 0.002%）
砷（总）	小于 3ppm	小于 3ppm
结晶碳酸钙	小于 5%	小于 1%

[0127]

[0128] * 不包括钠。

[0129] ** 根据 USP 不能进行（在电感耦合等离子体 (ICP) 中进行）。

[0130] *** 在 ICP 测量中的干扰阻止更低浓度的分析。

[0131] 对照产品 - 标准护理

[0132] 患有甲状旁腺功能减退症的患者的治疗包括通过施用钙和维生素 D 纠正低血钙 (Cusano 等人，2012 ;Fong&Kahn, 2012)。口服补充剂以元素钙 (1-2g，每日 3 次）和用于直接治疗术后甲状旁腺功能减退症的骨化三醇 (0.25-1μg，每日 2 或 3 次）开始。处于严重和 / 或长期低钙血症的风险中的患者，以 2g，每日 3 次的剂量的元素钙和以 0.5μg 每日 3 次剂量的骨化三醇来开始。存在几种类型的钙补充剂。其可以或不以处方获得。所有这些钙补充剂都减轻神经和肌肉性能，并促进正常的心脏功能 (Straub, 2007)：

[0133] - 碳酸钙 (Tums extra strength, Cal-plus, 钙尔奇，Os-Cal 500)- 在所有可用的钙补充剂的制剂中，碳酸钙是具有 40% 元素钙的最浓缩的钙补充剂之一。存在许多市售的制剂。元素钙的每日总剂量需要被滴定，以尽量减少维生素 D 的每日剂量，并保持患者无症状。离子化的钙在酸性环境中吸收最好 ;400mg 元素钙等于 1g 碳酸钙。

[0134] - 柠檬酸钙 (Citracal, Cal-Cytrate 250)-210mg 的元素钙等于 1g 柠檬酸钙。

[0135] - 葡萄糖酸钙 (Kalcinate)- 对于 IV 使用可获得。经 5-10 分钟慢慢地输注 ;10mL 葡萄糖酸钙包含约 90mg 元素钙 ;1000mg 葡萄糖酸钙等于 90mg 元素钙。

[0136] 在本研究中，对照组中的患者继续摄入其常规钙补充剂，并因此以标准的护理来治疗。

[0137] 剂量和施用

[0138] 阶段 1

[0139] 合格的受试者接受 ACC 片。本研究试验产品的每一剂量由 50mg 或 200mg 的来自每片中的 ACC 的元素钙组成。

[0140] 阶段 II

[0141] 合格的受试者以交叉研究设计接受 ACC 片。对照组用标准护理来治疗（通过获取其定期钙补充剂）。本研究试验产品的每一剂量由 50mg 或 200mg 的来自每片中的 ACC 的元素钙组成。

[0142] 表 3 :研究处理的剂量

[0143]

组	处理
试验产品	药片，每个包含 50 mg 或 200 mg 的来自 ACC 的元素钙，用于口服使用。
对照产品	标准护理。

[0144] ACC 的作用机制和效应还有待揭示。因此，剂量和有利吸收条件（进食 / 禁食）的选择基于本研究的第一阶段的结果。尽管最终剂量必须专门为每个患者确定，预期，确定将允许两个公式之间容易转换的 ACC 和 CCS 之间的转换系数将是有可能的。

[0145] 在对照组中的钙剂量根据每个和每一位患者的已知病史和用药常规来确定。

[0146] 片剂施用在整个治疗期间由受试者每日进行 3 次。IP 施用被记录在到临床研究中心 (CRC) 的每次就诊的病例报告表 (CRF)，IP 施用记录中。具有未使用的药片的资料袋在就诊天返回 CRC 单位，计数并记录在 CRF 中。

[0147] 分配受试者以治疗

[0148] 将受试者根据随机列表随机分配到治疗组之一。使用模块随机进行随机化。

[0149] 盲法

[0150] 这是一个开放标签的研究。受试者、研究者和参与受试者的评估、监测、分析和数据管理的任何人员对受试者制剂分配并非未知。发起人负责准备、分发和标记试验产品 IP。

[0151] 研究设计

[0152] 研究由两个阶段组成 :

[0153] 阶段 I

[0154] 登记了以前诊断并长期治疗原发性甲状旁腺功能减退症的十 (10) 个受试者。每天 CCS 摄入量逐渐被减少量的来自 ACC 的元素钙代替。五 (5) 个受试者在用餐前摄入 ACC，且其他五 (5) 个受试者在用餐后摄入 ACC。在整个阶段密切监测治疗的安全性和效力。

[0155] ACC 的吸收使用对白蛋白 (CA) 值测试校正的每周血清钙来评估。在阶段 I 的筛选和结束时测试尿液中钙的排泄量。

[0156] 阶段 II- 登记了以前诊断并长期治疗原发性甲状旁腺功能减退症的十 (10) 个新受试者。

[0157] 将受试者随机分配至以下治疗之一持续 6 周 :

[0158] 1. 标准护理 - 研究之前常规使用的同样的元素钙制剂和剂量。

[0159] 2.ACC- 来自 ACC 的元素钙的既定剂量（基于本研究的第一阶段发现的转换系数和进食 / 禁食条件）。

[0160] 与常规每日剂量的维生素 D(1-α D3) 一起施用两种制剂。

[0161] 在治疗结束时，各组接受替代制剂持续另一个 6 周。

[0162] ACC 的优良吸收使用每周的血液测试，以计算血清钙值进行评估。在每个治疗的筛选和结束时测试尿液中钙的排泄量。

[0163] 以下是研究程序的详细描述 :

[0164] 将合格的受试者治疗如下 :

[0165] 阶段 I

[0166] I- 第 -21(+/-17) 天筛选 :诊断为原发性甲状旁腺功能减退症 (参见 4.1 节的定义),并在本研究开始之前用钙和维生素 D 补充剂治疗至少 1 年,且没有重大的肾脏或肝脏疾病的受试者,被邀请至 CRC。在诊所中,受试者都接受会见,将其病史和其目前药剂都记录并且他们签署了知情同意书 (ICF)。受试者涉及进行抽血化验血清钙、P、肌酐和白蛋白水平。进行白蛋白校正钙 (Ca) 的计算。受试者被指示要进行 24 小时尿液收集用于 Ca、P 和肌酐。受试者被要求填写食品和药剂日记连续 3 天,以评估其日常饮食中钙的摄入量。育龄女性进行尿妊娠试验。符合所有纳入标准,并无任何排除标准的合格的受试者入选本研究。

[0167] 受试者通过电话或现场告知其是否有资格进入本研究。

[0168] I- 第 0 天 :合格的受试者到达 CRC,在那里询问其自从上次就诊以后其医疗状况的任何变化。进行血液测试,以确定血清钙、P 和白蛋白基线值。进行在基线的 CA 计算。

[0169] 受试者接受一包 ACC 片,每片包含 50mg 或 200mg 元素钙 (根据钙补充剂的每日总量,14 天的供应量 +5 备用片)。用 ACC 代替 CCS 根据以下公式来计算 :

[0170] NTDC = ITDC - [0.1×ITDC(mg CCS)]+[0.05×ITDC(mg ACC)]

[0171] *ITDC- 最初每日总钙摄入量 (mg)

[0172] **NTDC- 新的每日总钙摄入量 (mg)

[0173] 最初的每日总摄入元素钙的 10% (以 mg) 被 5% 的来自 ACC 的元素钙代替 (以 mg,从最初的每日总摄入量计算)。每天摄入的维生素 D 保持不变。

[0174] 由医师专门为每个受试者进行每天片剂的数量的计算 (根据钙补充剂的每日剂量)。

[0175] 受试者根据其单独计算的 NTDC 被指示每天服用 ACC 片的量 :

[0176] 1. 五个受试者被指示早餐后、午餐后和晚餐后服用片剂。

[0177] 2. 五个受试者被指示早餐前、午餐前和晚餐前服用片剂。

[0178] 受试者被指示在试验过程中继续其常规药剂摄入。

[0179] I- 第 3(±1) 天 :受试者到达 CRC 并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算以排除低血钙 (Ca<7.0mg/dL)。如果 CA 值在所期望的目标范围 (7.0-10.0mg/dL) 中,受试者继续服用在 I- 第 0 天指示的钙剂量。如果 CA 值低于 7.0mg/dl 或在 10.0mg/dl 以上,根据医师的决定,做出钙摄入量的改变。

[0180] I- 第 7(±1) 天 :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算 :

[0181] a. 转换系数 0.5 :

[0182] 如果 CA = 基线,则 20% (以 mg,从初始的每日总摄入量计算) 的元素钙,被 10% (以 mg,从初始的每日总摄入量计算) 的来自 ACC 的元素钙代替。

[0183] NTDC = ITDC - [0.2×ITDC(mg CCS)]+[0.1×ITDC(mg ACC)]

[0184] b. 转换系数 0.75 :

[0185] 如果 CA< 基线,则 10% (以 mg,从初始的每日总摄入量计算) 的元素钙,被 7.5% (以 mg,从初始的每日总摄入量计算) 的来自 ACC 的元素钙代替。

[0186] NTDC = ITDC - [0.1×ITDC(mg CCS)]+[0.075×ITDC(mg ACC)]

[0187] CA<7.00mg/dl 强制结束治疗。

[0188] c. 转换系数 0.25 :

[0189] 如果 CA> 基线,则 10%(以 mg,从初始的每日总摄入量计算)的元素钙,被 2.5%(以 mg,从初始的每日总摄入量计算)的来自 ACC 的元素钙代替。

[0190] NTDC = ITDC - [0.1×ITDC(mg CCS)]+[0.025×ITDC(mg ACC)]

[0191] 询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。受试者接受有关 ACC 新剂量的指示并被提醒根据其单独计算的 NTDC) 一天在早晨、在中午和晚上,餐前或餐后(基于其初始分配)服用的片剂的量。提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0192] I- 第 10(±1) 天 :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算以排除低血钙 (Ca<7.0mg/dL)。如果 CA 水平在期望的目标范围 (7.0-10.0mg/dL) 内,则受试者继续服用在 I- 第 7 天指示的钙剂量。如果 CA 水平低于 7.0mg/dL 或高于 10.0mg/dL,则根据医师的决定做出钙摄入量的改变。

[0193] I- 第 14(±1) 天 :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算以排除低血钙 (Ca<7.0mg/dL)。如果转换公式 (a-c,I- 第 7 天)都不导致血清钙值在期望的目标范围 (7.0-10.0mg/dL) 内,该研究被终止。

[0194] 询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。

[0195] CCS 的初始日常补充的 50%基于 I- 第 7 天发现的转换系数(公式 a-c) 被 ACC 代替 :

[0196] a. 转换系数 0.5 :50%(以 mg,从初始的每日总摄入量计算)的元素钙,被 25%(以 mg,从初始的每日总摄入量计算)的来自 ACC 的元素钙代替。

[0197] NTDC = ITDC - [0.5×ITDC(mg CCS)]+[0.25×ITDC(mg ACC)]

[0198] b. 转换系数 0.75 :50%(以 mg,从初始的每日总摄入计算量)的元素钙,被 37.5%(以 mg,从初始的每日总摄入计算量)的来自 ACC 的元素钙代替。

[0199] NTDC = ITDC - [0.5×ITDC(mg CCS)]+[0.375×ITDC(mg ACC)]

[0200] c. 转换系数 0.25 :50%(以 mg,从初始的每日总摄入计算量)的元素钙,被 12.5%(以 mg,从初始的每日总摄入计算量)的来自 ACC 的元素钙代替。

[0201] NTDC = ITDC - [0.5×ITDC(mg CCS)]+[0.125×ITDC(mg ACC)]

[0202] 受试者接受一包 ACC 片,每片包含 50mg 或 200mg 元素钙(根据其单独计算的 NTDC,14 天的供应量 +5 备用片)。受试者接受有关 ACC 新剂量的指示并被提醒根据其单独计算的 NTDC 一天在早晨、在中午和晚上,餐前或餐后(基于其初始分配)服用的片剂的量。提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0203] I- 第 21(±1) 天 :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算以排除低血钙 (Ca<7.0mg/dL)。询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。如果 CA 水平低于 7.0mg/dL 或高于 10.0mg/dL,将受试者排除在本研究之外(基于医师的决定)。如果 CA 水平在期望的目

标范围 (7.0-10.0mg/dL) 内，基于 I- 第 7 天发现的转换系数（公式 a-c），进行 ACC 对 CCS 的日常补充的完全代替：

[0204] a. 转换系数 0.5：100％（以 mg) 的元素钙初始每日总摄入量被 50％的来自 ACC 的元素钙代替（以 mg，从初始的每日总摄入量计算）。

[0205] NTDC = ITDC - [ITDC(mg CCS)]+[0.5×ITDC(mg ACC)]

[0206] b. 转换系数 0.75：100％（以 mg) 的元素钙初始每日总摄入量被 75％的来自 ACC 的元素钙代替（以 mg，从初始的每日总摄入量计算）。

[0207] NTDC = ITDC - [ITDC(mg CCS)]+[0.75×ITDC(mg ACC)]

[0208] c. 转换系数 0.25：100％（以 mg) 的元素钙初始每日总摄入量被 25％的来自 ACC 的元素钙代替（以 mg，从初始的每日总摄入量计算）。

[0209] NTDC = ITDC - [ITDC(mg CCS)]+[0.25×ITDC(mg ACC)]

[0210] 受试者接受有关 ACC 新剂量的指示并被提醒根据其单独计算的 NTDC 在早晨、在中午和晚上，餐前或餐后（基于其初始分配）一天服用的片剂的量。提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0211] 受试者接受容器以在其下次预定的就诊之前进行 24 小时尿液收集。

[0212] I- 第 27(±1) 天通过电话：提醒受试者进行 24 小时尿液收集。

[0213] I- 第 28(±1) 天 - 结束阶段 I：受试者到达 CRC，并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算。受试者提供 24 小时的尿液收集的容器用于 Ca、P 和肌酐以测试钙尿。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征（手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁）。

[0214] 在决定是否开始阶段 II 计划的研究的交叉部分之前，检查阶段 I 的结果。总结阶段 I 的数据，通过接受的 ACC 代替 CCS 的量显示对每个受试者、每个组和整体上的 CA 水平之间。

[0215] 阶段 II

[0216] 登记了以前诊断并长期治疗原发性甲状旁腺功能减退症的十 (10) 个新受试者。

[0217] 将受试者随机分配至以下治疗之一持续 6 周：

[0218] 1. 标准护理 (CCS)- 研究之前常规使用的同样的元素钙剂量。

[0219] 2.ACC- 来自 ACC 的元素钙的既定剂量（基于本研究的阶段 I 中发现的转换系数和进食 / 禁食条件）。

[0220] 与常规每日剂量的维生素 D(1-α D3) 一起施用两种制剂。

[0221] 在治疗结束时，各组接受替代的制剂持续另一个 6 周。

[0222] ACC 的优良吸收使用每周的血液测试，以计算血清 CA 值进行评估。在每个治疗的筛选和结束时测试尿液中钙的排泄量。

[0223] I- 第 -21(+/-17) 天筛选：诊断为原发性甲状旁腺功能减退症，并在本研究开始之前用钙和维生素 D 补充剂治疗至少 1 年，且没有重大的肾脏或肝脏疾病的受试者，被邀请至 CRC。在诊所中，受试者都接受会见，将其病史和其目前药剂都记录并且他们签署了知情同意书 (ICF)。受试者涉及进行抽血化验血清钙、P、肌酐和白蛋白水平。进行 CA 的计算。受试者被指示要进行 24 小时尿液收集用于 Ca、P 和肌酐水平。要求受试者填写食品和药剂日

记连续 3 天，以评估其日常饮食中钙的摄入量。育龄女性进行尿妊娠试验。符合所有纳入标准，并无任何排除标准的合格的受试者入选本研究。

[0224] 受试者通过电话或现场告知其是否有资格进入本研究。

[0225] II- 第 0 天 ：合格的受试者到达 CRC，在那里询问其自从上次就诊以后其医疗状况的任何变化。进行血液测试，以定义血清钙、P 和白蛋白基线值。进行在基线的 CA 计算。

[0226] 将受试者随机分配至以下治疗之一 ：

[0227] 1. 标准护理 (CCS)- 研究之前常规使用的同样的元素钙剂量。

[0228] 2.ACC- 来自 ACC 的元素钙的既定剂量（基于本研究的阶段 I 发现的转换系数和进食 / 禁食条件）。

[0229] 被分配到 ACC 治疗组的受试者，接受具有 ACC 片剂的容器，每片包含 200mg 元素钙 (35 天供应量 +5 备用片）。分配给 CCS 治疗组的受试者继续服用其常规钙补充剂。

[0230] 钙补充剂的确切剂量对各受试者根据已知的病史来确定。

[0231] 指示受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0232] II- 第 3(±1) 天 ：受试者到达 CRC，并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算以排除低血钙 (Ca<7.0mg/dL)。如果 CA 值在期望的目标范围 (7.0-10.0mg/dL) 内，则受试者继续服用在 II- 第 0 天指示的钙剂量。如果 CA 水平低于 7.0mg/dL 或高于 10.0mg/dL，则根据医师的决定做出钙摄入量的改变。

[0233] II- 第 7(±1) 天 ：受试者到达 CRC，并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征（手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁）。如果必要进行 ACC 或 CCS 的摄入量调整。

[0234] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0235] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0236] II- 第 10(±1) 天 ：受试者到达 CRC，并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算以排除低血钙 (Ca<7.0mg/dL)。如果 CA 值在期望的目标范围 (7.0-10.0mg/dL) 内，则受试者继续服用在 II- 第 7 天指示的钙剂量。如果 CA 水平低于 7.0mg/dL 或高于 10.0mg/dL，则根据医师的决定做出钙摄入量的改变。

[0237] II- 第 14(±1) 天 ：受试者到达 CRC，并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征（手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁）。

[0238] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0239] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0240] II- 第 21(±1) 天 ：受试者到达 CRC，并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征（手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁）。

[0241] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0242] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0243] 受试者接受容器以在其下次预定的就诊之前进行 24 小时尿液收集。

[0244] II- 第 34(±1) 天通过电话 :提醒受试者进行 24 小时尿液收集。

[0245] II- 第 35(±1) 天 :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算。受试者提供 24 小时的尿液收集的容器用于 Ca、P 和肌酐以测试钙尿。询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征 (手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。

[0246] 以前被分配到 CCS 治疗组的受试者,接受一包 ACC 片剂,每片包含 200mg 元素钙 (35 天供应量 +5 备用片)。指示以前分配到 ACC 治疗组的受试者恢复其正常的 CCS 补充。

[0247] 用于各受试者的钙补充剂的确切剂量由已知的病史来确定。

[0248] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0249] II- 第 38(±1) 天 :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算以排除低血钙 (Ca<7.0mg/dL)。如果 CA 水平在期望的目标范围 (7.0-10.0mg/dL) 内,则受试者继续服用在 II- 第 35 天指示的钙剂量。如果 CA 水平低于 7.0mg/dL 或高于 10.0mg/dL,则根据医师的决定做出钙摄入量的改变。

[0250] II- 第 42(±1) 天 :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算。询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征 (手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。如果必要进行 ACC 或 CCS 的摄入量调整。

[0251] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0252] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0253] II- 第 45(±1) 天 :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算以排除低血钙 (Ca<7.0mg/dL)。如果 CA 值在期望的目标范围 (7.0-10.0mg/dL) 内,则受试者继续服用在 II- 第 42 天指示的钙剂量。如果 CA 水平低于 7.0mg/dL 或高于 10.0mg/dL,则根据医师的决定做出钙摄入量的改变。

[0254] II- 第 49(±1) 天 :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算。询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征 (手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。

[0255] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0256] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0257] II- 第 56(±1) 天 :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算。询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征 (手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。

[0258] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0259] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0260] 受试者接受容器以在其下次预定的就诊之前进行 24 小时尿液收集。

[0261] II- 第 69(±1) 天通过电话 :提醒受试者进行 24 小时尿液收集。

[0262] II- 第 70(±1) 天 - 结束阶段 II :受试者到达 CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行 CA 的计算。受试者提供 24 小时的尿液收集的容器用于 Ca、P 和肌酐以测试钙尿。询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生的任何副作用或 AE 和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。

[0263] 非预期就诊可在本研究期间的任何时间以受试者的要求或由研究者认为必要时来进行。记录非预期就诊的日期及原因。所有的评估是任选的,由研究者酌情进行。

[0264] 如果受试者提前停止参与研究(在第 7.4 节规定的原因),则发生早期停止就诊,并类似于终止就诊(阶段 I 的第 28 日,阶段 II 的第 70 日)。

[0265] 本研究程序总结于表 4 和 5。

[0266] 阶段 I

[0267] 表 4 :阶段 I 程序计划表。

[0268]

	天									
评估/评价	(-21) (±21)	*(-2) (±2)	0 (±1)	3 (±1)	7 (±1)	10 (±1)	14 (±1)	21 (±1)	27 (±1)	28 (±1)
CRC 电话		X							X	
CRC 就诊	X		X	X	X	X	X	X		X
血清 CA 测试	X		X	X	X	X	X	X		X
血清白蛋白测试	X		X	X	X	X	X	X		X
血清 P 测试	X		X	X	X	X	X	X		X
24 h 尿液收集: Ca 测试	X									X
24 h 尿液收集: 肌酐测试	X									X
24 h 尿液收集: P 测试	X									X
妊娠测试**	X									

[0269]

食品和药物日记	X									
与异常血清 Ca 水平相关的症状和病征: 调查表					X		X	X		X
IP 供应			X				X			
不良作用					继续					

[0270] * 告知患者其有资格参加本研究

[0271] ** 用于育龄女性

[0272]

阶段 II

表 5：阶段 II 程序计划表。

评估/评价	天 -21 ±21	*-2 ±2	0 ±1	3 ±1	7 ±1	10 ±1	14 ±1	21 ±1	34 ±1	35 ±1	38 ±1	42 ±1	45 ±1	49 ±1	56 ±1	69 ±1	70 ±1
CRC 电话		X							X							X	
CRC 就诊	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X
血清 CA 测试	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X
血清白蛋白测试	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X
血清 P 测试	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X
24 h 尿液收集：Ca 测试	X									X							X
24 h 尿液收集：肌酐测试	X									X							X
24 h 尿液收集：P 测试	X									X							X
妊娠测试**	X																
食品和药物日记	X																
与异常血清 Ca 水平相关的症状和病征；调查表					X		X	X		X		X		X	X		X
IP 供应			X							X							
不良作用																	

继续

*告知患者其有资格参加本研究

**用于育龄女性

[0273] 研究前（筛选）程序

[0274] 筛选时对每个受试者进行以下筛选评估：

[0275] - 签署知情同意表

[0276] - 受试者病史

[0277] - 受试者目前用药

[0278] - 受试者面谈

[0279] - 妊娠测试（育龄女性）

[0280] - 食品和药物日记，持续 3 天

[0281] - 符合纳入 / 排除标准

[0282] 给药前程序

[0283] 对每个受试者进行以下评估：

[0284] - 受试者血液测试用于计算血清 CA 值、P 和白蛋白

[0285] -24 小时尿液收集用于钙、P 和肌酐

[0286] 研究测试

[0287] 血液测试

[0288] 从第 0 天开始为每个 CRC 就诊的各受试者进行血液测试：阶段 I：第 0、3、7、10、14、21、28 天。

[0289] 阶段 II：第 0、3、7、10、14、21、35、38、42、45、49、56、70 天。

[0290] 24 小时尿液收集测试

[0291] 在以下进行 24 小时尿液收集测试：

[0292] 阶段 I：研究结束（第 28 天）

[0293] 阶段 II：第 35 天和研究结束（第 70 天）

[0294] 与低血钙相关的症状和病征

[0295] 在以下 CRC 就诊期间，询问问题列表，目的是鉴定与低血钙相关的症状和病征：

[0296] 阶段 I：第 7、14、21、28 天

[0297] 阶段 II：第 7、14、21、35、42、49、56、70 天

[0298] 研究措施

[0299] 血液测试 - 白蛋白校正的钙 (ca) 的计算、磷和白蛋白血清水平

[0300] 钙和白蛋白

[0301] 低血钙的初始评估通常基于对白蛋白浓度校正的血清总钙的测量。正常 CA 值范围从 8.5mg/dL 至 10.2mg/dL。患有甲状旁腺功能减退症的受试者中，期望的目标 CA 值为 7.0-10.0mg/dL。

[0302] 血清总钙和白蛋白之间的关系由以下规则确定：对于每 1-g/dL 下降的血清白蛋白浓度，血清总钙浓度下降了 0.8mg/dL。该规则假设正常白蛋白等于 4.0mg/dL 且正常钙为 10.0mg/dL。

[0303] 计算：钙（校正的，mmol/L）＝钙（测量的，mmol/L)+{(40 - 白蛋白 (g/L))x0.02}

[0304] 磷 (P)：

[0305] 血清磷测试测量血液中的磷酸盐的量。正常值范围从 2.4-4.1mg/dL。

[0306] 24 小时尿液收集测试

[0307] 对于 24 小时尿液收集，必须收集经 24 小时时间段的所有的尿液。尿液样品必须包括开始收集 24 小时后的最后尿液。

[0308] 钙：

[0309] 测试结果可反映饮食摄入：

[0310] 表 6：尿液中的钙

[0311]

饮食中钙的低量：	50-150 毫克 (mg)/24- 小时样品	1.25-3.75 毫摩尔 (mmol)/ 天
饮食中钙的平均量：	100-250mg/24- 小时样品	2.5-7.5mmol/ 天
饮食中钙的高量：	250-300mg/24- 小时样品	6.2-7.5mmol/ 天

[0312] 尿液钙水平 >300mg/24 小时或 > 体重的 4mg/kg/24 小时被认为是高钙尿症。

[0313] 肌酐：

[0314] 肌酐清除率测试对经 24 小时收集的尿液样品进行。其被用于确定肾小球滤过率，这有助于测量肾功能如何。

[0315] 表 7：尿液中的肌酐

[0316]

肌酐清除率:	男性(小于 40 岁): 107-139 毫升/分钟 (mL/min)或 1.8-2.3 毫升/秒(mL/sec)
	女性(小于 40 岁): 87-107 mL/min 或 1.5-1.8 mL/sec 肌酐清除率值通常随着年龄的增长而下降 (对于 20 岁后每 10 年，正常值下降 6.5 mL/min)。

[0317] * 正常成人尿液钙 / 肌酐比值为 <220mg/g。

[0318] 磷：

[0319] 磷酸根尿液测试测量经 24 小时收集的尿液的样品中的磷酸根的量 (24 小时尿液测试)。磷酸根是包含矿物磷的带电的离子。

[0320] 表 8：尿液中的磷酸盐

[0321]

成人：	0.4-1.3 克 (g)/24- 小时尿液样品	13-42 毫摩尔 (mmol)/ 天
钙 - 和磷酸盐 - 限制膳食：	小于 1.0g/24- 小时尿液样品	小于 32mmol/ 天

[0322] 测量尿液中的磷酸盐的测试的结果本身很少有用。其应通常与其他测试的结果一起进行解释。通常同时测量钙和磷酸盐水平。

[0323] 评估与低血钙相关的症状和病征

[0324] 要求受试者回答问题：是否存在与低血钙相关的症状和病征（手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉疼痛、心律不齐、和抑郁）。

[0325] 将受试者的回答记录在 CRF 中。

[0326] 治疗的安全性

[0327] 钙、P 和白蛋白血清水平

[0328] 正常 CA 值范围从 8.5mg/dL 至 10.2mg/dL。患有甲状旁腺功能减退症的受试者中，期望的目标 CA 值为 7.0-10.0mg/dL。低血钙的初始评估通常根据以下公式，基于对白蛋白浓度校正的血清总钙的测量：钙（校正的，mmol/L）＝钙（测量的，mmol/L)+{(40 - 白蛋白

(g/L))x0.02}

[0329] 血清磷测试测量血液中的磷酸盐的量。正常值范围从 2.4-4.1mg/dL。

[0330] 尿液钙、P 和肌酸酐测试

[0331] 尿液钙水平 >300mg/24 小时或 > 体重的 4mg/kg/24 小时被认为是高钙尿症。

[0332] 正常尿液肌酐水平在男性（小于 40 岁）中为 107-139 毫升 / 分钟 (mL/min) 或 1.8-2.3 毫升 / 秒 (mL/sec)，且在女性（小于 40 岁）中为 87-107mL/min 或 1.5-1.8mL/sec。肌酐清除率值通常随着年龄的增长而下降（对于 20 岁后每 10 年，正常值下降 6.5mL/min）。

[0333] 尿液钙测量与肌酸酐相关地表示。

[0334] 尿液钙 (mg/dL) :尿液肌酐 (mg/dL) 比例的正常参考区间为 <0.14。

[0335] 正常磷水平是 0.4-1.3 克 (g)/24 小时尿液样品。

[0336] 并发症

[0337] 记录与低血钙相关的症状和病征（手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁）。

[0338] 统计分析

[0339] 这是两阶段前瞻性研究，其中在患有甲状旁腺功能减退症的受试者中评价 ACC 作为 CCS 的代替物。效力通过代替较大剂量的 CCS 的较小剂量的 ACC 能够提供患有甲状旁腺功能减退症的受试者需要的补充钙的程度来评价。安全性由不良事件 (AE)，包括与尿钙排泄相关的那些 AE 来评价。统计计划和分析由 TechnoSTAT Ltd. 进行。

[0340] 设计注意事项

[0341] 这是两阶段研究，其中第一阶段评价患有甲状旁腺功能减退症的受试者中从 CCS 至 ACC 的预定的转换系数。在此阶段取决于受试者响应、以及因此此阶段的适应性特性，逐渐增大比例的 CCS 被 ACC 所代替。

[0342] 如果试验的第一阶段证明了转换系数的安全性，则开始第二阶段。第二阶段包括以新招募的受试者的交叉试验；新招募的受试者即没有参加试验的第一阶段的受试者。这些受试者的每个是以 CCS 对照或 ACC 治疗 1:1 比例模块随机化的。在交叉的第二组中各受试者接受他或她在第一组没有接受的替代的制剂。

[0343] 每个受试者参与阶段 I 的研究持续时间为从筛选（第 -21 天）直至结束（第 28 天）的 49 天，且每个受试者参与阶段 II 的研究持续时间为从筛选（第 -21 日）直至结束（第 70 天）的 91 天。

[0344] 对于阶段 I 和阶段 II，去 CRC 就诊分别发生在第 0（基线）、3、7、10、14、21 和 28 天（结束阶段 I），和在第 0（基线）、3、7、10、14、21、35、38、42、45、49 和 70 天（结束阶段 II）。

[0345] 血液和尿液测试和临床调查在受试者去诊所就诊时进行。

[0346] 分析设置

[0347] 安全性人群

[0348] 安全性人群由在两个研究阶段中作为试验程序的部分施用 ACC 或 CCC 的所有患者组成。

[0349] 效力人群

[0350] 效力人群由没有可能影响结果的重大违规条目的阶段 II 受试者组成，对于其存在关于血清 CA 水平的基线和至少一些治疗后的数据。可能影响结果的违规条目的程度由

对结果未知的评审人（即盲审）来确定。

[0351] 缺失值处理：仅观察到的数据被使用；丢失数据不估算。

[0352] 终点

[0353] 安全性

[0354] 产品相关的不良事件的总发生率。

[0355] 收集和记录所有不良事件和严重不良事件。

[0356] 主要效力

[0357] - 阶段 I 中：实现血清 CA 和尿液钙水平正常化的来自 ACC 的元素钙剂量的变化

[0358] - 阶段 II 中：血清 CA 和尿液钙水平

[0359] 次要效力

[0360] 次要效力终点包括：

[0361] - 与钙水平相关的副作用

[0362] - 与低钙血症相关的症状

[0363] - 血清磷水平

[0364] 数据分析

[0365] 概述

[0366] 对安全性人群进行安全性和受试者处置 (subject disposition) 分析。对效力人群进行效力分析。分析并单独呈现阶段 I 和 II 结果。

[0367] 数据总结于表中，列出均值、标准差中位数、最小值、最大值和对于连续数据的受试者的编号，或在适当时在表中列出用于分类数据的计数和百分比。表以研究组、随着时间的推移和整体展示。在阶段 I 中，研究组由餐前或餐后摄入 ACC 组成。在阶段 II 中，研究组由 CCS 或 ACC 组成。

[0368] 进行所有的统计分析并使用 SAS® 系统创建数据附录。评估不顺应性、放弃、和可能的协变量，诸如年龄和性别的效应，以确定对来自本研究的结果的普遍适用性的影响。

[0369] 受试者处置

[0370] 将受试者处置制成表；将登记、暴露 (exposed)、过早结束和完成受试者的数目进行总结。

[0371] 准备放弃的名单，包括中止的原因、和中止的时间。

[0372] 安全性

[0373] 安全性分析性质是描述性和叙事性的，SAE 和 AE 使用 MedDRA 编码并以身体系统、优先项、研究组、严重性和与程序的相关性制成表。如适当，指示“正常”值和“异常”值之间的变化的描述性统计和转变分析表被提供用于实验室测试。

[0374] 主要效力分析：阶段 I

[0375] 以数字和图表总结阶段 I 数据，对每个受试者、每个组和接受的 ACC 代替 CCS 的量的钙水平之间的整体的关系。对于组和整体的每个个体，ACC 和血清 CA 水平随着时间的推移，通过转移表以数字和图表描述。

[0376] 主要效力分析：阶段 II

[0377] 随着时间的推移的血清 CA 水平对每个组以及随着时间的推移对于平行配对时间点 (D0、D35；D3、D38；D7、D42；D10、D45；D14、D49；D21、D56) 的组之间的差异以数字和图表

总结。取决于差的分布，在平行时间点各组之间的CA水平差异通过配对t-检验或Wicoxon Sign-rank检验进行比较。

[0378] 二次分析

[0379] 与变化相关的副作用是血清钙水平，以及与低血钙相关的症状在阶段I和阶段II两者中以组来描述。血清磷水平随着时间的推移在阶段I和阶段II中由组以及阶段II中平行时间点下的组之间的差异来描述。对于两个阶段，转移表以组来提供。

[0380] 中期分析

[0381] 在两个研究阶段的任何一个中不存在形式上计划的中期分析。然而，持续监测包括血清CA和磷水平的安全性数据。在决定是否开始阶段II计划的研究的交叉部分之前，检查阶段I的结果。

[0382] 数据管理

[0383] 将调查数据记录在纸质CRF上。仅对登记的受试者填写CRF（不是筛选失败）。通过他/她在CRF上的签名，研究者证明，对每例患者收集的数据是准确、完整和清晰的。

[0384] 在本临床调查中产生的所有数据根据TechnoSTAT标准程序进行管理。数据及其他研究文件在完成调查后存档最少6年。

[0385] 安全性

[0386] 不良事件的定义

[0387] 不良事件是与IP的使用时间上相关的任何不良医学迹象（包括异常的实验室发现）、症状或疾病，无论认为是否与IP相关。新状况或已有状况的恶化被认为是AE。被认为是临床上显著的所有异常发现必须被记录为不良事件。

[0388] 由首席研究者认为显著的急性医疗状况（其从研究开始时的48小时内被评估）（诸如发麻、嘴周围麻木、痉挛、焦虑、肌肉收缩、癫痫发作、喘鸣、精神异常、恶心、呕吐、食欲不振、便秘、胃痛、口渴、口干和增加排尿）的病例，被记录在病例报告表(CRF)内且将受试者排除在本实验之外。

[0389] 在所有情况下，应尽可能识别AE的病因并且通过记录在CRF内通知发起人。

[0390] 不良事件与IP的关系定义如下：

[0391] 表9：不良事件与IP的关系

[0392]

最有可能相关的:	遵循来自研究IP施用的合理时间顺序，并不能由患者的临床数据的已知特征合理地解释
可能相关的:	遵循来自研究IP施用的合理时间顺序，但可由患者的临床状态产生
可能不相关的:	时间相关使得研究IP不可能与观察到的事件有任何合理的相关。
不相关的:	未观察到研究IP的关系。

[0393] 严重不良事件(SAE)是以下的任何不良事件：

[0394] -导致死亡。

[0395] -导致危及生命的疾病或伤害。

[0396] -导致身体结构或身体机能的永久性损伤

[0397] -需要住院治疗或延长现有住院治疗。

[0398] -导致内科或外科干预，以防止对身体结构或身体机能的永久性损害

[0399] -导致胎儿窘迫、胎儿死亡、先天畸形或出生缺陷。

[0400] 不良事件强度的定义

[0401] 以下定义应由调查医师使用以描述不良事件的强度。

[0402] 以下是应被用于描述不良事件强度的唯一定义。仅一个严重性定义应被用于每个不良事件（例如，“轻度 - 中度”是不可接受的）。

[0403] 表 10 :不良事件的强度

[0404]

强度	定义
轻度	容易耐受的不良经验
中度	足够令人不安以干扰日常活动的不良经验。
重度	阻止正常的日常活动的不良经验。

[0405] 异常实验室值

[0406] 如果满足以下任一条件，临床实验室异常被记录 :

[0407] - 实验室异常在重复测试中存在

[0408] 异常的度需要主动管理（例如剂量变化、中断治疗、更频繁的随访评估等）。

[0409] 正常实验室值是 :

[0410] - 血清钙（白蛋白校正的）:7.0mg/dL 至 10.0mg/dL

[0411] - 血清磷 :2.4mg/dL 至 4.1mg/dL

[0412] - 尿液钙 :>300mg/24 小时

[0413] - 尿液肌酐 :40mg/dL 至 300mg/dL

[0414] - 尿液磷酸盐 :0.4-1.3 克 (g)

[0415] 记录和处理不在正常参考范围内的异常的实验室结果。

[0416] 记录不良事件

[0417] 对于每个不良事件，所有以下详细内容应记录在受试者的 CRF :

[0418] - 不良事件的完整描述。

[0419] - 发病的日期和时间。

[0420] - 解决的日期和时间。

[0421] - 由调查医师根据在第 16.2 节的定义评估的事件的严重性。

[0422] - 与研究 IP 的关系由调查医师进行评估。

[0423] - 采取的行动（如有）。

[0424] - 任何进一步随访的结果和详细内容。

[0425] 预期的副作用（不良事件）

[0426] 以下是 ACC 试验产品可能的不良事件的列表。列表是基于来自使用天然 ACC 的先前经验和与摄入钙的晶形相关的效应 :

[0427] - 嗳气

[0428] - 排气

[0429] - 便秘

[0430] - 恶心

[0431] - 呕吐

[0432] - 食欲不振

[0433] - 增加的排尿

[0434] - 肾损害

[0435] - 混乱

[0436] - 不规则的心脏节律。

[0437] 试验 3 :在摄入皮质类固醇的个体中的骨钙吸收

[0438] 进行了旨在评价包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 的钙源在患有钙吸收不良相关的疾病、紊乱和状况的受试者中用于骨矿化的生物利用度的实验。进行了多中心前瞻性、随机化、平行、双盲、主动控制的研究 (a multicenter prospective,randomized,parallel,double-blind,active controlled study),将无定形碳酸钙 (ACC) 与结晶碳酸钙 (CCC) 对用皮质类固醇长期治疗的患者的骨矿物质密度的效应进行比较。

[0439] 试验的主要目的是,与 CCC 相比,评估用来自 ACC 的钙治疗对暴露于皮质类固醇长期治疗的患者中的骨矿物质密度的保持的效力。次要目的是,与 CCC 相比,评价 ACC 对研究期间骨折的盛行的效应。进一步的次要目标是,与 CCC 相比,评价 ACC 对骨代谢生物标志物的效应。试验的又进一步的目的是评价 ACC 在该人群中的安全性谱。

[0440] 选择研究人群

[0441] 研究人群包括采取连续长期皮质类固醇治疗的六十 (60) 名受试者,每个治疗组三十 (30) 名受试者。

[0442] 实验产品的描述

[0443] 本研究中使用的稳定的无定形碳酸钙是通过由 Amorphical Ltd. 提供的低浓度磷酸丝氨酸和柠檬酸盐 (在最终产品中小于 0.5%) 稳定化的、合成的 ACC,如上文所公开。

[0444] 对照产品的描述

[0445] 对照产品在每个胶囊中包含 500mg 的结晶碳酸钙 (200±5mg 元素钙) 和 167mg 的蔗糖。在对照产品中的元素钙水平等于治疗组中的元素钙水平,以与结晶碳酸钙相比,评价无定形碳酸钙的效应。

[0446] 剂量和施用

[0447] 合格的受试者随机接受两种治疗方法之一。本研究补充剂的各剂量由在每个胶囊中 667mg 的 ACC 或 500mg 的 CCC 组成。

[0448] 表 11 :研究治疗的剂量

[0449]

组	治疗
试验产品	包含 667 mg ACC 的用于口服使用的片(200 mg 元素钙)
对照产品	包含 500 mg CCC 和 167 mg 的蔗糖的用于口服使用的片 (200 mg 元素钙) 。

[0450] 剂量的选择是基于对于年龄 19-50 的受试者,元素钙的推荐的每日摄入量 (1000mg/ 天)。对照中的钙剂量等于 ACC 产品中的元素钙水平。

[0451] 分配受试者以治疗

[0452] 将受试者根据随机列表随机分配到治疗组之一。在中心内使用模块随机化进行两个研究组的每个的随机化。

[0453] 盲法

[0454] 在临床试验中施用的口服钙治疗是盲法的。受试者、研究者和参与受试者的评估、监测、分析和数据管理的任何人员对受试者制剂分配是盲法的，发起人除外，发起人负责准备、分发和标记试验产品。盲法的标签由不盲法的发起人在给药前固定到小瓶。

[0455] 随机化程序

[0456] 本研究是双盲法并因此 CRC 工作人员和受试者对整个研究的代码分配保持盲法。在施用前，对每个受试者分配了单独的数字，并根据预定的计算机生成的随机化列表来处理。计算机生成的算法被用于将受试者分配到治疗组。治疗组合物由发起人制备并在运输之前将标签固定到小瓶。指示医院药剂师根据群组分配列表将产品分配至 CRC。

[0457] 研究设计

[0458] 将当前正在开始长期（≥ 6 个月）糖皮质类固醇治疗的六十 (60) 名患者随机分配到 2 组中的一个 (n = 30)。治疗组中的患者接受无定形碳酸钙 (ACC) 且主动控制组中的那些接受结晶碳酸钙 (CCC)。当需要时，基于医师的决定，将两种制剂都补充维生素 D。整个试验中评价安全性参数。

[0459] 常规地评价由于各种医疗状况向 CRC 住院的患者。由于其医疗状况正在开始用糖皮质类固醇长期治疗的受试者被视为试验的候选人并被邀请至 CRC 用于筛选。

[0460] 筛选（第 -7 天）- 受试者签署知情同意书 (ICF)。进行化学和血液学测试：测量了钠、钾、血红蛋白、沉降速率、白细胞钙（总的、白蛋白校正的）、磷酸盐、碱性磷酸酶、肌酐、和白蛋白。此外，测试了血清 PTH、25- 羟基维生素 D、和促甲状腺激素 (TSH)。测量了钙和肌酐的尿排泄。一般健康状况由病史和体格检查来检查。符合所有纳入标准和无任何排除标准的合格的受试者入选本研究。

[0461] 受试者通过电话或现场告知其是否有资格进入本研究。

[0462] 第 1 次就诊（第 0 天）- 合格的受试者被邀请到 CRC。进行在基线的 DEXA 扫描。测量腰椎 (L2-4)、股骨颈和全身的 BMD。记录现有骨折的迹象。测量了白蛋白、钙 (Ca)、磷和肌酐 (Cr) 的血清水平、以及尿中的 Ca 和 Cr。测量了骨代谢的生化标志物（血清骨钙素 (OCN)、P1NP（总原胶原 1 型 N- 端前肽）、骨型碱性磷酸酶 (BAP) 和 I 型胶原交联 N- 端肽 (NTX) 的尿水平）。受试者随机接受片剂包，每个胶囊包含以制剂之一 (ACC 或 CCC) 的 200mg 元素钙（用于 42 天供应量的 210 片 +20 备用片，共 230 片）。指示受试者每天服用 5 粒胶囊，持续前 6 周 (0-42 天)，餐后，早上 2 片和晚上 3 片。为了尽量减少钙相关的副作用的风险，经常服用钙的受试者，被指示在整个试验中停止其钙补充剂的摄入。建议受试者基于医师的决定服用维生素 D3 补充剂。要求受试者保持每天写日记来记录其糖皮质类固醇的使用。

[0463] 第 2 次就诊（第 42±3 天）- 询问受试者可能发生的任何副作用或 AE。询问受试者自从其最后一次就诊 CRC 后发生的任何骨折事件。受试者与 CRC 的代表完成 TSQM 问卷。受试者接受另外的片剂包，每个片剂包含与在先前就诊中已接受的相同制剂 (ACC 或 CCC) 的 200mg 元素钙（总 210 片，42 天供应量 +20 备用片）。提醒受试者每天服用 5 片，持续下一个 6 周（第 42-84 天），餐后，早上 2 片和晚上 3 片。为了尽量减少钙相关的副作用的风

险，经常服用钙的受试者，被提醒在整个试验中停止其钙补充剂的摄入。建议受试者基于医师的决定服用维生素 D3 补充剂。要求受试者保持每天写日记来记录其糖皮质类固醇的使用。

[0464] 第 3 次就诊 -（第 84±3 天）- 进行 DEXA 扫描。测量腰椎 (L2-4)、股骨颈和全身的 BMD。测量了白蛋白、钙 (Ca)、磷和肌酐 (Cr) 的给药前血清水平、以及尿中的 Ca 和 Cr。还测量了骨代谢的生化标志物。询问受试者可能发生的任何副作用或 AE。询问受试者自从其最后一次就诊 CRC 后发生的任何骨折事件。受试者接受另外的片剂包，每个片剂包含与在第 0 天接受的相同制剂的 200mg 元素钙（总 210 片，42 天供应量 +20 备用片）。指示受试者每天服用 5 片，持续下一个 6 周（第 84-126 天），餐后，早上 2 片和晚上 3 片。为了尽量减少钙相关的副作用的风险，经常服用钙的受试者，被提醒在整个试验中停止其钙补充剂的摄入。建议受试者基于医师的决定服用维生素 D3 补充剂。要求受试者保持每天写日记来记录其糖皮质类固醇的使用。

[0465] 第 4 次就诊 -（第 126±3 天）- 询问受试者可能发生的任何副作用或 AE。询问受试者自从其最后一次就诊 CRC 后发生的任何骨折事件。受试者接受另外的片剂包，每个胶囊包含与在先前就诊中接受的相同制剂 (ACC 或 CCC) 的 200mg 元素钙（总 210 片，42 天供应量 +20 备用片）。提醒受试者每天服用 5 片，持续下一个 6 周（第 126-168 天），餐后，早上 2 片和晚上 3 片。为了尽量减少钙相关的副作用的风险，经常服用钙的受试者，被提醒在整个试验中停止其钙补充剂的摄入。建议受试者基于医师的决定服用维生素 D3 补充剂。要求受试者保持每天写日记来记录其糖皮质类固醇的使用并在下次就诊时将其带来。

[0466] 第 5 次就诊 -（第 168±1 天）- 进行 DEXA 扫描。测量腰椎 (L2-4)、股骨颈和全身的 BMD。测量了白蛋白、钙 (Ca)、磷和肌酐 (Cr) 的给药前血清水平、以及尿中的 Ca 和 Cr。还测量了骨代谢的生化标志物。询问受试者自从其最后一次就诊 CRC 后发生的任何骨折事件。受试者与 CRC 的代表完成 TSQM 问卷。询问受试者可能发生的任何副作用或 AE。

[0467] 结果量度

[0468] - 骨矿物质密度 (BMD) 的保持 -BMD 由双能 X- 射线吸光测定法 (DEXA) 扫描定义。DEXA 结果呈现为 Z 值（将特定扫描的结果，与相同的年龄、体重、种族和性别下的其他人的结果比较）。小于 -1.5 的 Z 值增加老化以外的因素造成骨质损失的担心。

[0469] - 骨折患病率 - 每次就诊时记录骨折事件。

[0470] - 增加骨形成标志物

[0471] - 减少骨再吸收标志物

[0472] - 评估钙副作用：

[0473] 安全性分析

[0474] 安全性分析性质是描述性和叙事性的。不论是否与研究治疗相关，安全性终点是不良事件 (AE) 和严重不良事件 (SAE)。还包括了血清钙水平和尿钙和肌酐水平。

[0475] 效力分析

[0476] 主要效力终点是 BMD 的保持，通过由 DEXA 扫描计算的 Z 值。如果原始值分布大致正常，通过对原始值的独立组 t 检验测试假设。如果数据基本上偏离正常，使用对数变换以标准化数据。如果应用后者后，数据仍然偏离正常，使用非参数的 Wilcoxon 秩和检验。如果 Z 值在治疗中相对于对照是显著较小的，则试验被认为是成功的。

[0477] 以下是本研究的次要效力终点：

[0478] -减少骨折的频率

[0479] -TSQM(用于药物的治疗满意度问卷)域：14项心理测验学上稳健和验证的问卷，由四个量表组成：有效性量表、副作用量表、方便和全局满意度量表。

[0480] 试验4：易发生骨质疏松症的人群中的钙胃肠道吸收。

[0481] 本研究的目的是评价易发生骨质损失相关的紊乱的人群中对来自ACC源的钙的胃肠吸收。试验是对绝经后女性进行的使用双稳定钙同位素技术的临床研究。

[0482] 具有从更年期不超过5年的十个绝经后女性(表12中的人口数据)，被纳入研究。所有受试者展示18-29的BMI，表面上是健康的，并未患有任何严重内科疾病或代谢性骨紊乱。排除标准包括，基于食物日记摄入，通过结合饮食(来自补充剂和食品)具有估计的每日钙的摄入量>1100mg、血清中由值<20ng/ml展示的维生素D缺乏、高钙血症、肾结石、炎性肠病、吸收不良、慢性腹泻、过去一个月内使用抗生素的女性，和患有消化道、肝、肾、或炎症疾病的女性。在过去的6个月内服用口服类固醇、抗惊厥药、双膦酸/盐/酯类、雌激素化合物、降钙素、或特立帕肽的女性，也被排除在研究之外。在由the Ethical Committee of Sourasky Medical Center,Tel-Aviv,Israel批准方案后，书面知情同意获自每个女性。

[0483] 表12：参加本研究的10名女性的人口数据

[0484]

变量	
年龄，y	55±3.2
身高，cm	159.3±3.7
体重，kg	66.8±5.1
BMI,kg/cm^2	26.2±1.9
PTH,pg/ml	30.3±13.2
FSH,miu/ml	65.2±29.3
25-OHD,ng/ml	29.9±6.7

[0485] 结果是平均值±S.D

[0486] 吸收比例分析表明，所有10个受试者当施用ACC代替CCC时，显示钙吸收的显著升高。

[0487] 获自在早餐后接受胶囊的9个女性的结果的配对t-检验分析，显示ACC的钙吸收比例的显著升高。对于每个女性，与CCC相比，来自ACC的钙的相对吸收的平均增加为2.1倍($p<0.01$；图2)。

[0488] 作为两个分开的治疗组总体上，当与CCC相比，女性施用ACC时，存在钙吸收比例升高1.9($P<0.05$；图3)。

[0489] 在禁食过夜后空腹接受胶囊的十名女性中的一个显示钙吸收比例的4.6倍升高

(图 4)。

[0490] 实验细节

[0491] 胶囊和 $CaCl_2$ 溶液配制和标记

[0492] ACC(Amorphical Ltd.)通过在 32% HCl 中溶解其适当的量连同 $^{44}CaCO_3$(浓缩至 96.1%,CMR,Moscow,Russia)本质地来标记,之后,将其再沉淀返回至包含以 15mg ^{44}Ca/ 处理标记的 192mg 元素钙的 ACC 粉末(600mg 粉末)。总体而言,制备 3 批 ^{44}ACC,并送至扇形磁热电离质谱(MAT261;Finnigan,Bremen,Germany)以 44:42 摩尔比分析,并用原子吸收测量钙含量(Analytical Research Services,Ben-Gurion University,Beersheva,Israel)。进行另外的测试评估每个批次的无定形含量:X 射线衍射(XRD;The Nanotechnology Institution,Ben-Gurion University)、定量偏振光谱(QPS)、偏光显微镜(POM)和干燥度。CCC(Zifroni Chemicals Suppliers Ltd.,Rishon-Lezion,Israel)通过用 $^{44}CaCO_3$(浓缩至 96.1%,CMR,Moscow,Russia)均质化其适当的量本质地来标记,以达到包含以 15mg ^{44}Ca/ 处理标记的 192mg 元素钙的 CCC 粉末(480mg 粉末)。为匹配 ACC 胶囊中的体积,将蔗糖(每处理 120mg;FAGRON Gmbh&Co.KG,Rotterdam,The Netherlands)添加至每个胶囊。制备一批 ^{44}CCC,并送至扇形磁热电离质谱(MAT261;Finnigan,Bremen,Germany)以 44:42 摩尔比分析。

[0493] i.v. 同位素 $^{42}CaCl_2$ 溶液制备方案由 Concept for Pharmacy Ltd. Kfar-Saba,Israel 在层流通风橱下进行以确保无菌。将适当量的 $^{44}CaCO_3$(浓缩至 96.1%,CMR,Moscow,Russia)溶解在 37% HCl 中并与 0.45% NaCl 混合。用 10N 的 NaOH 调整 pH 至 5.5。将溶液通过 0.22μ 过滤器灭菌压入无菌容器中。将单独的剂量(1.5mg ^{42}Ca/ 剂量)转移入无菌小瓶中供以后使用。使用前,将等份送至无菌和热原检测(Aminolab,Nes-Ziona,Israel),并通过原子吸收(Analytical Research Services,Ben-Gurion University,Beersheva,Israel)测量钙含量。本研究中的所有 i.v. 溶液是无菌的并无热原的。

[0494] 尿液收集和分析

[0495] 每个胶囊施用后,进行 24 小时的尿液收集用于测量钙、钠、钾、尿素、肌酐和稳定同位素分析。遵循先前公布的方法(Yergey 等人,1994)在 Baylor College of Medicine Houston,Texas,USA 进行钙的吸收分析。草酸铵被用于沉淀尿液样品中的钙同位素(Yergey 等人 1980)。然后提取的钙的量被用于钙同位素比率测量。使用扇形磁热电离质谱(MAT 261;Finnigan,Bremen,Germany)确定该量。

[0496] 人样品的药代动力学计算

[0497] 如(Yergey 等,1994)中描述的计算膳食钙的吸收比例(α_{24h})。简言之,比率 α_{24h} 是用于两个标签的血浆消失曲线下的面积的比率的算术有效表示。

[0498] 统计分析

[0499] 如试验 1 中所述进行方差的统计分析。

[0500] 上述试验的结果证实,稳定的 ACC 比 CCC 在易发生骨相关的紊乱的两类人模型中具有较高的胃肠吸收。由于结晶钙的吸收是有限的,并且过量的钙可能导致不良作用,在当需要较高的钙摄取以维持骨矿物质密度的情况下,这种增强的吸收可以是有益的。

[0501] 试验 5:在骨矿物质密度损失相关的紊乱中阻止或延缓骨质损失。

[0502] 本试验的目的是评价来自包含各种稳定剂(P-Ser、柠檬酸或蔗糖)的ACC源的钙，对于在骨质疏松大鼠模型(卵巢切除;OVX)中由股骨和脊椎骨矿物质密度(BMD)评估的骨矿化过程的可用性。

[0503] 在本研究中，测试了四组大鼠(3组卵巢切除的和1组假处理)。将动物根据表13进行处理。

[0504] 表14显示了试验期间大鼠的平均食物摄入量和体重。与假处理相比，在三组OVX组观察到显著的体重增加。尽管事实是，与假处理相比，所有OVX组中食物摄入量较低。

[0505] 表13:根据处理分配大鼠

[0506]

组	处理
假处理 (n=10)	含有 1%元素钙的标准实验室饮食(Altromin Spezialfutter GmbH & Co, #1320P Seelenkamp, Germany)，自由采食。
OVX ACC (P-Ser) (n=10)	富含来自由0.0275%磷酸丝氨酸稳定的合成的ACC(ACC_PS, SOP PSC002, Amorphical Ltd.)的1%元素钙的低钙饮食(TD.95027, Harlan Inc, Jerusalem, Israel)，自由采食。
OVX ACC (CIT) (n=10)	富含来自由0.0275%柠檬酸稳定的合成的ACC(ACC_CIT, SOP PCA001, Amorphical Ltd.)的1%元素钙的低钙饮食(TD.95027, Harlan Inc, Jerusalem, Israel)，自由采食。
OVX ACC (SUC) n=10)	富含来自由蔗糖和氢氧化钠稳定的合成的ACC(ACC SUC, SOP SUC001, Amorphical Ltd.)的1%元素钙的低钙饮食(TD.95027, Harlan Inc, Jerusalem, Israel)，自由采食。

[0507] OVX=卵巢切除;ACC=无定形碳酸钙;PS=磷酸丝氨酸;CIT=柠檬酸盐;SUC=蔗糖

[0508] 表14:大鼠在实验开始和结束时的平均食物摄入和总体重

[0509]

	假处理	OVX		
		ACC_P-Ser	ACC_CIT	ACC_SUC
大鼠体重(第0天)	258 (16)	245 (15)	244 (11)	255 (14)
大鼠体重(第90天)	299 (29)	337 (18)	341 (16)	357 (22)
*体重增加(%)	23.7[a]	36.1[b]	41.2[b]	40.7[b]
*平均食物摄入	17.2 (1.0)[a]	14.0 (0.8)[b]	14.5 (0.5)[bc]	15.5 (0.7)[c]

[0510] 每周记录值。体重增加表示从实验开始至结束重量的增加比率。值表示为平均值(SD)。

[0511] 单因素ANOVA:P<0.001。字母代表Tukey事后比较检验。

[0512] 在该模型中如预期的，OVX组的股骨的显微CT扫描揭示了小梁骨矿物质密度(Tb.BMD)和其他形态参数，即:骨体积/组织体积(BV/TV)、小梁骨数量(Tb.N)、小梁骨厚度(Tb.Th)的显著减少;且小梁骨间距(Tb.Sp)显著升高。此外，3个OVX组与假处理动物在所有股骨微结构拓扑学和方位参数即:小梁骨因子(TBPf)、结构模型指数(SMI)和各向异性的程度(DA)方面显著不同(表15)。

[0513] 4-L脊椎显微CT扫描结果显示，与所有其他OVX组相比，假处理组仅在BMD、BV/TV和Tb.N参数方面显著较高，且在TBPf和SMI微结构参数方面显著较低(表15)。

[0514] 不同于小梁骨BMD，在股骨和脊椎两者的骨皮质BMD(Ct.BMD)方面，所有组之间没

有观察到差异（表 15）。

[0515] 在由显微 CT 测试的所有参数中，在 ACC+P-Ser、ACC+CIT 和 ACC+SUC 组之间在股骨和脊椎两者中未观察到差异（表 6），表明稳定 ACC 的化合物本身对 BMD 或另外的骨形态或微结构参数无效应。

[0516] 表 15：通过显微 CT 研究的形态和微结构拓扑和方位参数

[0517]

		假处理	OVX		
			ACC+P-Ser	ACC+CIT	ACC+SUC
(A) 股骨	*Tb. BMD, g/cm^3	305 (43)^a	120 (26)^b	112 (20)^b	116 (27)^b
	Ct. BMD, g/cm^3	775 (79)^a	771 (32)^a	761 (84)^a	743 (55)^a
	*Tb. BV/TV, %	55 (7.5)^a	22 (3.7)^b	21 (3.6)^b	22(3.6)^b
	*Tb. N, mm^{-1}	4.5 (0.3)^a	2.0 (0.3)^b	2.0 (0.3)^b	2.1 (0.3)^b
	*Tb. Sp, m	145 (15)^a	583 (67)^b	621 (125)^b	613 (92)^b
	*Tb. Th, m	121 (1)^a	109 (6)^b	105 (6)^b	104 (6)^b
	*TBPf, mm^{-1}	-11.4 (4.0)^a	5.20 (1.6)^b	5.99 (1.7)^b	4.60 (1.7)^b
	*SMI	-0.84 (0.8)^a	1.40 (0.1)^b	1.46 (0.2)^b	1.32 (0.2)^b
	*DA	1.46 (0.1)^a	1.64 (0.2)^b	1.82 (0.2)^b	1.61 (0.2)^b
(B) 脊椎	*Tb. BMD, g/cm^3	235 (41)^a	107 (37)^b	124 (39)^b	130 (29)^b
	Ct. BMD, g/cm^3	652 (50)^a	687 (35)^a	663 (41)^a	669 (48)^a
	*Tb. BV/TV, %	42 (6.6)^a	22 (5.1)^b	24 (5.4)^b	25 (5.3)^b
	*Tb. N, mm^{-1}	3.6 (0.5)^a	2.1 (0.4)^b	2.1 (0.9)^b	2.2 (0.4)^b
	Tb. Sp, m	221 (34)^a	335 (53)^a	297 (48)^a	333 (57)^a
	Tb. Th, m	117 (5)^a	105 (7)^a	107 (10)^a	111 (6)^a
	*TBPf, mm^{-1}	-0.99 (3.5)^a	7.04 (2.5)^b	5.85 (2.8)^b	5.73 (1.7)^b
	*SMI	0.41 (0.5)^a	1.51 (0.3)^b	1.56 (0.7)^b	1.40 (0.2)^b
	DA	2.03 (0.3)^a	2.64 (0.7)^a	2.36(0.4)^a	2.13 (0.4)^a

[0518] (A) 股骨远端干骺端。(B) 第 4 腰椎。

[0519] 小梁骨矿物质密度 (Tb.BMD)、皮质 BMD(Ct.BMD)、小骨梁体积 / 组织体积 (Tb.BV/TV)、小骨梁数量 (Tb.N)、小骨梁间距 (Tb.Sp)、小骨梁厚度 (Tb.Th)、小梁骨模式因子 (TBPf)、结构模型指数 (SMI)，各向异性度 (DA)。

[0520] 值相应于平均值 (±SD)。

[0521] 单因素 ANOVA：*P<0.001。字母代表 Tukey 事后比较检验。

[0522] 实验细节

[0523] 动物

[0524] 将具有 247±14g 的平均体重的四十只 16-17 周龄雌性 Sprague Dawley 大鼠 (Harlan Inc.,Jerusalem,Israel) 群养在 14 个笼子里 (2-3 只大鼠 / 笼子)，并在控制室内条件 (21±2℃和 12- 小时暗 - 光周期) 下适应。在 7 天适应期间，大鼠饲以包含 1％元素钙的标准实验室饮食 (#2018SC 大鼠饲料，Harlan Inc.Jerusalem,Israel)，和自由采食去离子水。

[0525] 7 天适应阶段后，大鼠使用腹腔内 (IP) 注射包含氯胺酮 (Fort Dodge AH Ltd.Overland Park,USA) 和甲苯噻嗪 (EuroVet AH Ltd.Bladel,UK) 的麻醉剂溶液 (0.1ml/100g) 来麻醉。

[0526] 将大鼠随机分配并根据其分配的四组操作：假处理 (假处理 - 卵巢切除的；用含有来自 CCC 的 1％元素钙的标准实验室饮食喂养)，且其他三组使用根据 Lasota 和

Danowska-Klonowska(2004)Rocz Akad Med Bialymst 49Suppl 1:129-131 的双侧背侧方法来切除卵巢 (OVX)，并分为 OVX-ACC+PS、OVX-ACC+CIT 和 OVX-ACC+SUC。操作后，对大鼠提供与适应阶段相同的条件下的 7 天恢复期，自由采食标准实验室饮食和包含 1.5ml/400ml 安乃近 (Vitamed Ltd.,Binyamina,Israel) 和 1mg/kg 恩氟沙星 (Buyer Ltd. Leverkusen,Germany) 的去离子水。

[0527] 实验处理

[0528] 在恢复期结束时，将大鼠根据组的分配，在如上述相同的控制室内条件下进行群养 (2 只大鼠 / 笼)。在整个处理期间 (90 天) 提供自由采食的分配的食物颗粒 (表 13 中描述的) 和去离子水。每周记录食物摄入和体重 (表 14 中描述的)。对于动态组织形态学分析，荧光染料钙黄绿素 (20mg/kg 体重，Sigma-Aldrich，Israel) 在第 76 和 86 天时 IP 注射至所有大鼠。第 90 天时，将大鼠在代谢笼中单独饲养，并剥夺食物和水 18 小时。从各代谢漏斗收集尿，并保存在 -80℃用于未来在试验结束 (时间 90) 时分析骨再吸收生化标志物。在尿取样后立即，提取血清样品用于评价 90 天的形成生化标志物。通过 CO_2 处死所有大鼠。将右股骨和第 4 腰椎切下，包裹上浸有生理盐水缓冲液的纱布垫，并保存在 -80℃用于测量骨显微 CT 扫描。将第五腰椎储存在与右股骨相同的条件下用于机械测试。将右胫骨解剖并立即放置在 4℃下 3.7％甲醛溶液 (F1636,Sigma-Aldrich,Israel) 中 24h 用于结构和动态组织形态学测量。

[0529] 微型计算机断层扫描 (μ CT) 扫描

[0530] 右股骨和第 4 腰椎的小梁骨和皮质骨微结构以 μ CT 扫描仪 (Skyscan1174,Kartuizersweg Kontich,Belgium) 进行分析。扫描仪对于骨矿物质密度 (BMD) 的校准根据制造商说明书使用具有 0.25 和 0.75g/cm^3 密度的指定的大鼠模型杆 (Skyscan,Kartuizersweg Kontich,Belgium) 进行。

[0531] 扫描分析之前，将股骨和第 4 腰椎从 -80℃中取出，放置在塑料中 (根据制造商指导)。每个股骨的远端区域以 13.8μm 的各向同性分辨率扫描小梁骨和皮质骨参数。使用 Skyscan Nrecon 软件 (版本 1.6.4,Skyscan) 应用改进的算法进行重建。将感兴趣的体积 (VOI) 设置到生长板下 0.8mm，并远端延伸 1.5mm。在 VOI 内的小梁骨和皮质段，使用扫描仪配有的 CTan 分析软件 (版本 1.11 Skyscan)，通过每～ 5 片描绘椭圆形轮廓来提取。小梁骨和皮质 BMD、骨体积 (BV/TV，％)、小梁骨数量 (Tb.N)、小梁骨厚度 (Tb.Th，μm)、小梁骨间距 (Tb.Sp，μm) 连同小梁骨模式因子 (TBPf) 和结构模型指数 (SMI) 的微结构参数一起，由 CTan 分析仪软件 (版本 1.11 Skyscan) 自动计算。

[0532] 来自每只大鼠的第 4 腰椎以 13.8μm 各向同性分辨率进行扫描且将 VOI 设置为覆盖从椎体的中心的 1.25mm 厚横截面，用于在与以上描述的用于股骨的相同程序中评价小梁骨和皮质骨参数。

[0533] 试验 6 :在代谢性骨相关的紊乱中增加骨矿物质密度

[0534] 本发明人进行了旨在评价无定形碳酸钙 (ACC) 在代谢性骨紊乱，并特别是如卵巢切除 (OVX) 的大鼠模型中呈现的骨质疏松症中对骨矿物质密度和骨比例的效应的研究，其中 ACC 与用于骨质疏松症的标准药剂组合施用。在本试验中，测试了五组大鼠 (4 组 OVX 和 1 组假处理)。操作后，将所有大鼠留下未处理 (用标准实验室饮食喂养) 以发展骨质疏松，为期 2 个月。在诱导期结束时，将动物用来自两种不同钙来源 :无定形碳酸钙 (ACC)

或结晶碳酸钙 (CCC)(表 16) 的粒料形式的特殊食物混合物来处理。原子吸收仪 (Varian AA240,Palo Alto,CA,USA) 证实了来自两种混合物的颗粒包含～1%元素钙,除了在原始食物颗粒中发现的量外 (22IU 维生素 D/g),并无添加的维生素 D。此外,将动物根据其组分配用盐水或 2μg/kg 阿仑膦酸盐 (ALN)i.v 注射 (3 次 / 周),如表 16 所述。

[0535] 表 16 :根据处理分配大鼠

[0536]

	组	处理
假处理	假处理	自由采食包含来自 CCC(Socal®沉淀碳酸钙)的 1%元素钙的低钙饮食 (TDK95027, Harlan Inc.)并皮下注射盐水(0.9% NaCl, 100μl/100g b.w) 3 次\周。

[0537]

OVX	CCC	自由采食包含来自 CCC(Socal®沉淀碳酸钙)的 1%元素钙的低钙饮食 (TDK95027, Harlan Inc.)并皮下注射盐水(0.9% NaCl, 100μl/100g b.w) 3 次\周。
	ACC	自由采食包含来自合成的无定形碳酸钙 [由 Mr. Oren Meiron, Amorphical 提供的 ACC (1%PS & 2%柠檬酸盐)]的 1%元素钙的低钙饮食(TDK95027, Harlan Inc.)并皮下注射盐水(0.9% NaCl, 100μl/100g b.w) 3 次\周。
	CCC+ALN	自由采食包含来自 CCC(Socal®沉淀碳酸钙)的 1%元素钙的低钙饮食 (TDK95027, Harlan Inc.)并皮下注射阿仑膦酸盐(2μg/kg, 为 100μl/100g b.w) 3 次\周。
	ACC+ALN	自由采食包含来自合成的无定形碳酸钙 [由 Mr. Oren Meiron, Amorphical 提供的 ACC (1%PS & 2%柠檬酸盐)]的 1%元素钙的低钙饮食(TDK95027, Harlan Inc.)并皮下注射阿仑膦酸盐(2μg/kg, 为 100μl/100g b.w) 3 次\周。

[0538] OVX = 卵巢切除 ;CCC = 结晶碳酸钙 ;ACC = 无定形碳酸钙 ;ALN = 阿仑膦酸盐 ;PS = 磷酸丝氨酸

[0539] 表 17 显示了大鼠在试验期间的平均食物摄入量和体重。与假处理相比,在所有 OVX 大鼠中观察到显著的体重增加。尽管事实是,食物摄入在所有群体中是相似的。

[0540] 表 17 :大鼠的平均食物摄入和总体重

[0541]

	假处理	OVX			
		CCC	ACC	CCC+ALN	ACC+ALN
大鼠体重 (第 0 天)	258 (16)	244 (18)	240 (21)	243 (14)	244 (16)
大鼠体重 (第 60 天)	289 (14)	326 (19)	323 (26)	325 (15)	327 (17)
大鼠体重 (第 180 天)	319 (18)	359 (23)	360 (36)	353 (18)	355 (29)
体重增加(%)	24.5[a]	47.5[b]	50.3[b]	46[b]	45.4[b]
平均食物摄入 (g/天)	12.7 (0.73)	12.9 (0.34)	12.7 (0.82)	12.7 (0.72)	13.3 (1.4)

[0542] 每周记录值。体重增加表示从实验的开始到结束时重量的增加比率。将值表示为平均值 (SD)。单向 ANOVA:$p<0.05$。字母表示 Fishers LSD 事后比较检验。

[0543] 来自各组的代表性股骨远端和第 4 腰椎的显微 CT(μCT) 三维微结构示意重建在图 5 中来呈现。股骨干骺端小梁骨以及椎体的重建使得能够区分三个不同的组 :与所有其

他组相比具有观察到的最高小梁骨区的包括假处理的第一组（图 5A），具有最低的小梁骨区的包括 OVX-CCC 的第二组（图 5B），与 CCC 相比具有小梁骨区中度增加的包括 OVX-ACC 和 OVX-CCC+ALN 的第三组（图 5C 和 5D），以及，与第三组相比，具有小梁骨区的另外增加的包括 OVX-ACC+ALN 的第四组（图 5E）。

[0544] 在四组之间观察到的差异还反映在图 6 和表 18 呈现的小梁骨矿物质密度 (BMD) 和在股骨干骺端和第 4 腰椎的形态测定分析中。

[0545] 如图 6A-B 中所示，与所有四个 OVX 组相比，假处理组的小梁骨股骨 BMD 显著更高。在 OVX 组内，与 CCC 处理的组的小梁骨 BMD 相比，ACC 处理的组（图 6A-B）的小梁骨股骨和脊椎 BMD 分别高 22％和 39％。与 CCC 处理的组的小梁骨 BMD 相比，CCC+ALN 处理的组的小梁骨股骨和脊椎 BMD 分别高 49％和 72％。与 CCC 处理的组的小梁骨 BMD 相比，ACC+ALN 处理的组的小梁骨股骨和脊椎 BMD 分别高 75％和 105％，以及代替 CCC 将 ACC 添加至 ALN 分别在股骨和脊椎中增加了 26％和 33％的 BMD，表示 ACC 与 ALN 组合对 BMD 值有积极加性效应。

[0546] 不同于小梁骨 BMD，在股骨和脊椎两者的皮质骨 BMD(Ct.BMD) 观察到，所有组间无差异（表 18）。

[0547] 表 18：通过 μCT 扫描获得的微结构形态测定分析

[0548]

		假处理	OVX			
			CCC	ACC	CCC+ALN	ACC+ALN
(A) 股骨	Tb. N, mm^{-1}	4.1 (0.7)	1.5 (0.3)	1.7 (0.1)	2.3 (0.3)	2.5 (0.3)
	Tb. Sp, μm	167 (41)	682 (93)	584 (95)	360 (64)	323 (47)
	Tb. Th, μm	111 (9)	110 (10)	112 (7)	102 (11)	105 (7)
	Ct. BMD, g/cm^3	750 (32)	756 (30)	750 (67)	741 (58)	771 (27)
	TBPf, mm^{-1}	-7.0 (6.4)	7.6 (1.7)	6.1 (1.0)	7.3 (1.8)	6.3 (1.2)
	SMI	0.12 (0.2)	1.66 (0.2)	1.50 (0.1)	1.63 (0.2)	1.55 (0.1)
(B) 脊椎	Tb. N, mm^{-1}	3.60 (0.7)	1.75 (0.5)	2.05 (0.7)	2.54 (0.3)	2.73 (0.3)
	Tb. Sp, μm	199 (38)	374 (87)	352 (101)	268 (42)	251 (37)
	Tb. Th, μm	110 (17)	98.4 (5.3)	107 (13)	100 (11)	109 (13)
	Ct. BMD, g/cm^3	750 (32)	756 (30)	750 (67)	741 (58)	771 (27)
	TBPf, mm^{-1}	-0.7 (5.8)	8.5 (3.2)	6.8 (2.3)	4.8 (1.8)	4.4 (1.9)
	SMI	0.61 (0.8)	1.62 (0.3)	1.56 (0.2)	1.28 (0.2)	1.22 (0.3)

[0549] (A) 股骨远端干骺端。(B) 第 4 腰椎。Tb.N 表示在 mm^{-1} 区域内的小梁骨数目，Tb.Sp 表示小梁骨之间的平均距离，Tb.Th 表示小梁骨的平均厚度，TBPf 表示小梁骨模式因子且 SMI 代表结构模型指数。将值表示为平均值 (SD。

[0550] 与假处理相比，在所有切除卵巢的组中，股骨远端干骺端和第 4 脊椎的形态测定分析显示显著减少了小梁骨比例 (BV/TV)。与 CCC 组相比，ACC 在 OVX 组的股骨和脊椎中，分别呈现显著高 34％和 23％的小梁骨比例。CCC+ALN 组也获得了类似的结果，与 CCC 相比，其呈现股骨 37％的增加，且脊椎 46％的增加。与 CCC 相比，ACC 与 ALN 组合导致股骨增加 56％，且脊椎增加 71％，以及与 ALN+CCC 组相比，股骨和脊椎分别增加 19％和 25％，再次表示 ACC 与 ALN 组合对 BV/TV 值的增加的加性效应（图 6C-D）。

[0551] 与假处理相比，在所有切除卵巢的组中，在股骨和脊椎两者中还观察到小梁骨数目 (Tb.N) 的显著减少。与 CCC 组相比，在 OVX 组的股骨和脊椎中，ACC 呈现高平均 17％的

小梁骨数量。与 CCC 相比，在 CCC+ALN 组获得了较高的结果，其在股骨和脊椎中呈现平均 50％的增加。与 CCC 相比，ACC 与 ALN 组合导致在股骨和脊椎中增加了平均 62％，并且与 ALN+CCC 组相比，在股骨和脊椎中增加了平均 13％，表示 ACC 与 ALN 组合对 Tb.N 值的增加有加性效应（表 18）。

[0552] 与假处理相比，在所有卵巢切除组中，在股骨和脊椎两者中观察到小梁间距 (Tb.Sp) 的显著增加。与 CCC 组相比，在 OVX 组的股骨和脊椎中，ACC 呈现低平均 11％的间距数。与 CCC 组相比，CCC+ALN 组获得了较低的结果，其在股骨和脊椎中呈现减少平均 38％。与 CCC 相比，ACC 与 ALN 组合导致在股骨和脊椎中相似减少 54％，且与 ALN+CCC 组相比，在股骨和脊椎中减少平均 16％，还支持 ACC 与 ALN 组合的加性效应（表 18）。

[0553] 小梁骨厚度 (Tb.Th) 的分析揭示所有研究组之间中在股骨中无变化，且在脊椎中仅轻微变化，显示与 CCC 相比，在假处理组中小梁骨厚度仅增加了 12％，与 CCC 组相比，在 ACC 组中增加了 9％，与单独 CCC 相比，在 ALN 处理后仅增加 2％，且与假处理组类似，ACC 与 ALN 组合的小加性效应由 Tb.Th 值 11％的增加来反映（表 18）。

[0554] 拓扑学和取向参数的微结构分析：小梁骨模式因子 (TBPf) 和结构模型指数 (SMI) 揭示，卵巢切除干预导致股骨和脊椎两者中 TBPf 和 SMI 值增加。在股骨中，ACC 处理比 CCC+ALN 导致 TBPf 和 SMI 值较大的减少，CCC+ALN 在该区域仅对这些参数有轻微效应。然而，在脊椎中，与 CCC+ALN 相比，ACC 处理导致 TBPf 和 SMI 值的较小减少。与 CCC 处理相比，ACC+ALN 处理导致 TBPf 和 SMI 值在股骨中平均加性减少 12％，且在脊椎中减少 37％（表 18）。

[0555] 实验细节

[0556] 动物

[0557] 将具有 246±17g 的平均体重的五十三只 16 周龄雌性 Sprague Dawley 大鼠 (Harlan Inc.,Jerusalem,Israel) 群养在 26 个笼子里 (2-3 只大鼠 / 笼)，并在控制室内条件 (21±2℃和 12 小时暗 - 光周期）下适应。在 7 天适应期间，大鼠饲以包含 1％元素钙的标准实验室饮食 (#2018SC 大鼠饲料，Harlan Inc.Jerusalem,Israel)，和自由采食去离子水。

[0558] 对于施用不同钙源，制备特殊的食物颗粒。包含 0.02％钙的低钙啮齿类粒料（大鼠饲料 #TD95027 Harlan Inc.,Jerusalem,Israel) 被精细地磨碎，并分别与两种不同的钙源混合。CCC 混合物包含来自结晶碳酸钙（Socal® 沉淀碳酸钙）的 1％元素钙，且 ACC 混合物包含来自稳定的无定形碳酸钙（包含 1％磷酸丝氨酸和 2％柠檬酸盐；Amorphical Ltd.,Beer-Sheva,Israel) 的 1％元素钙。每一混合物分别制粒并室温下保持在密封袋中。

[0559] 7 天适应阶段后，大鼠使用腹腔内 (IP) 注射包含氯胺酮 (Fort Dodge AH Ltd.Overland Park,USA) 和甲苯噻嗪 (EuroVet AH Ltd.Bladel,UK) 的麻醉剂溶液 (0.1ml/100g) 来麻醉。

[0560] 将大鼠随机分配并根据其分配的五组操作：假处理（假处理 - 卵巢切除的；N = 9)，且其他四组通过根据 Lasota 和 Danowska-Klonowska(2004)Rocz Akad Med Bialymst 49 Suppl 1:129-131 的双侧背侧方法来切除卵巢 (OVX)，并分为 OVX-CCC(n = 10)、OVX-ACC(n = 10)、OVX-CCC+ALN(n = 12) 和 OVX-ACC+ALN(n = 12)。操作后，对大鼠提供 3 天恢复期，期间其用包含 1.5ml/400ml 安乃近 (Vitamed Ltd.,Binyamina,Israel) 和 1mg/

kg 恩氟沙星 (Buyer Ltd. Leverkusen, Germany) 的去离子水来处理。将动物在与适应阶段相同的条件下留下未处理，自由采食标准实验室饮食 2 个月以发展骨质疏松。

[0561] 2 个月后，大鼠根据如表 16 中描述的其分配开始处理 4 个月的阶段。在整个处理阶段，提供分配的补充粒料和去离子水自由采食。每周记录食物摄入和体重（表 17）。在处理阶段结束时，通过 CO_2 处死所有大鼠。将右股骨和第 4 腰椎切下，包裹上浸有生理盐水缓冲液的纱布垫，并保存在 -80℃用于测量骨显微 CT 扫描。

[0562] 微型计算机断层扫描（μCT）扫描

[0563] 右股骨和第 4 腰椎的小梁骨和皮质骨微结构以 μCT 扫描仪 (Skyscan1174, Kartuizersweg Kontich, Belgium) 进行分析。扫描仪对于骨矿物质密度 (BMD) 的校准根据制造商说明书使用具有 0.25 和 0.75g/cm^3 密度的指定的大鼠模型杆 (Skyscan, Kartuizersweg Kontich, Belgium) 进行。

[0564] 扫描分析之前，将股骨和第 4 腰椎从 -80℃中取出，放置在塑料中（根据制造商指导）。每个股骨的远端区域以 13.8μm 的各向同性分辨率扫描小梁骨和皮质骨参数。使用 Skyscan Nrecon 软件（版本 1.6.4, Skyscan）应用改进的算法进行重建。将感兴趣的体积 (VOI) 设置到生长板下 0.8mm，并远端延伸 1.5mm。在 VOI 内的小梁骨和皮质段，使用扫描仪配有的 CTan 分析软件（版本 1.11 Skyscan），通过每～ 5 片描绘椭圆形轮廓来提取。小梁骨和皮质 BMD、骨体积 (BV/TV，％)、小梁骨数量 (Tb.N)、小梁骨厚度 (Tb.Th，μm)、小梁骨间距 (Tb.Sp，μm) 连同小梁骨模式因子 (TBPf) 和结构模型指数 (SMI) 的微结构参数一起，由 CTan 分析仪软件（版本 1.11 Skyscan）自动计算。

[0565] 来自每只大鼠的第 4 腰椎以 13.8μm 各向同性分辨率进行扫描且将 VOI 设置为覆盖从椎体的中心的 1.25mm 厚横截面，用于在与以上描述的用于股骨的相同程序中评价小梁骨和皮质骨参数。

[0566] 上述试验的结果证实，稳定的 ACC 比 CCC 对骨矿物质密度和其他骨参数具有更高效应。此外，与 CCC 相比，ACC 与用于治疗骨质损失的标准药剂组合施用导致加性效应，允许减少双膦酸 / 盐 / 酯剂量，并证实，高度生物可利用的 ACC 可单独或与保守的药物治疗一起被用于增加骨矿物质密度并治疗代谢性骨紊乱、疾病和状况。

[0567] 试验 7：阻止或延缓代谢性骨紊乱的发病

[0568] 本发明人进行了旨在评价与结晶碳酸钙 (CCC) 相比，来自稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 的钙对预防骨代谢性紊乱和特别是如在卵巢切除 (OVX) 的大鼠模型中呈现的骨质疏松症的效应的研究。

[0569] 在本研究中，测试了五组大鼠（4 组切除卵巢的和 1 组假处理）。OVX 动物用来自四种不同钙源的粒料的形式的特殊食物混合物来喂养：商品化结晶碳酸钙作为对照（混合物 A），天然 ACC（胃石粉）（混合物 B），合成的 ACC（包含微量的磷酸丝氨酸）（混合物 C），和商品化结晶柠檬酸钙（混合物 D）。将假处理组施用与对照相同的食物。原子吸收仪 (Varian AA240, Palo Alto, CA, USA) 证实了来自所有四种混合物的颗粒包含～ 0.5％元素钙，并且如表 19 所述的，除了在原始食物颗粒中发现的量外 (22IU 维生素 D/g)，无添加的维生素 D。

[0570] 表 19：如通过原子吸收测量的，钙源和专门化的粒料的元素钙含量（％重量）

[0571]

	碳酸盐 (混合物 A)	胃石 (混合物 B)	ACC (混合物 C)	柠檬酸盐 (混合物 D)
钙源中% Ca^{2+}	34.54	28.1	33.0	18.3
粒料中% Ca^{2+}	0.54	0.54	0.53	0.55

[0572] 钙的来源获自：商品化结晶 $CaCO_3$（碳酸盐），来自澳大利亚螯虾红螯螯虾 (Cherax quadricarinatus) 的胃石粉（胃石），合成的稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 和来自商品化补充剂的柠檬酸钙（柠檬酸盐）。将值表示为平均值。

[0573] 表 20 显示了试验期间大鼠的平均食物摄入量和体重。与假处理相比，在所有 OVX 大鼠中观察到显著的体重增加。尽管事实是，食物摄入量在所有组之间是相似的。

[0574] 表 20：在实验的开始和结束时大鼠的平均食物摄入量和总体重

[0575]

	假处理	OVX			
		对照	胃石	ACC	柠檬酸盐
大鼠体重(第 0 天)	253 (3.5)	249 (3.3)	249 (5.2)	251 (4)	253 (4.7)
大鼠体重(第 90 天)	310 (8.3)	345 (5.8)	370 (6.4)	359 (4.2)	354 (5.6)
重量增加(%)	22.5[a]	38.5[b]	48.5[b]	43[b]	40[b]
平均食物摄入	15.2 (0.07)	15.2 (0.07)	15.2 (0.07)	15.1 (0.02)	15.2 (0.05)

[0576] 每周记录值。体重增加表示从实验开始至结束时重量的增加比率。值表示为平均值 (SD)。单因素 ANOVA：$P<0.05$。字母代表 Fisher-LSD 事后比较检验。

[0577] 来自各组的代表性股骨远端和第 4 腰椎的 μCT 三维微结构示意重建在图 7 中来呈现。股骨干骺端小梁骨以及椎体的重建使得能够区分三个不同的组：具有观察到的最高小梁骨区的包括假处理的第一组（图 7A），与假处理相比，具有最低的小梁骨区的包括 OVX 对照和柠檬酸盐的第二组（图 7B 和 7E），以及与假处理相比，具有小梁骨区中度减少的包括 OVX 胃石和 ACC 的第三组（图 7C 和 7D）。

[0578] 在三组之间观察到的差异还反映在图 8、图 9 和表 21 中呈现的小梁骨矿物质密度 (BMD) 和在股骨干骺端和第 4 腰椎的形态测定分析中。

[0579] 如图 8A 中所示，与以下所有四个 OVX 组相比，假处理组的小梁骨股骨 BMD 显著更高：对照、胃石、ACC 和柠檬酸盐，分别具有 64%、45%、50%和 63%的显著差异。与所有四个 OVX 组相比，假处理组的小梁骨脊椎 BMD 方面还获得了可比较的值，图 8B 中呈现的。在 OVX 组内，与对照组的小梁骨 BMD 相比，胃石和 ACC（图 8A 和 8B）的小梁骨股骨和脊椎 BMD 分别在股骨中显著高 56%和 38%，且在脊椎中显著高 38%和 32%。与对照相比，观察到柠檬酸盐的小梁骨股骨和脊椎 BMD 无显著差异。在胃石和 ACC 组之间的比较揭示胃石比 ACC 有利的在小梁骨股骨 BMD 的 13%的统计学差异，且在小梁脊椎 BMD 中无差异。

[0580] 不同于小梁骨 BMD，在股骨和脊椎两者的皮质骨 BMD(Ct.BMD) 观察到，所有组间无差异（表 21）。

[0581] 表 21：通过 μCT 扫描获得的形态测定分析和皮质骨矿物质密度 (Ct.BMD)

[0582]

		假处理	OVX			
			对照	胃石	ACC	柠檬酸盐
(A) 股骨	**Tb. N, mm^{-1}	6.1^{a} (0.9)	2.2^{b} (0.6)	3.5^{c} (0.6)	3.3^{c} (0.5)	2.4^{b} (0.5)
	**Tb. Sp, μm	111^{a} (28)	248^{b} (83)	158^{c} (46)	209^{d} (74)	226^{bd} (47)
	*Tb. Th, μm	31.5^{ac} (5.3)	29.0^{b} (0.8)	33.6^{a} (3.5)	30.9^{cb} (1.4)	29.1^{b} (2.0)
	Ct. BMD, g/cm^{3}	963 (51)	980 (57)	983 (62)	952 (53)	970 (53)
(B) 脊椎	**Tb. N, mm^{-1}	3.98^{a} (0.67)	1.57^{b} (0.33)	2.29^{c} (0.25)	2.24^{c} (0.34)	1.59^{b} (0.22)
	**Tb. Sp, μm	153^{a} (28)	254^{b} (74)	197^{c} (54)	229^{bc} (36)	262^{b} (60)
	Tb. Th, μm	84.6 (7.3)	87.5 (6.4)	83.8 (20.3)	93.5 (6.9)	86.6 (8.5)
	Ct. BMD, g/cm^{3}	933 (55)	950 (50)	959 (56)	961 (57)	943 (68)

[0583] (A) 股骨远端干骺端。(B) 第 4 腰椎。Tb.N 表示在 mm^{-1} 区域内的小梁骨数目，Tb.Sp 表示小梁骨之间的平均距离，Tb.Th 表示小梁骨的平均厚度。单因素 ANOVA：$^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$。字母代表 Fisher-LSD 事后比较检验。

[0584] 与假处理相比，在所有切除卵巢的组中，股骨远端干骺端和第 4 椎体的形态测定分析（图 9 和表 21）显示显著减少了小梁骨比例 (BV/TV) 和其数量 (Tb.N)。与假处理相比，对照组在股骨远端显著降低了平均 65%（图 9A 和表 21A）且在脊椎中降低了 60%（图 3A 和表 3B）。然而，与假处理相比，OVX 胃石和 ACC 组分别在股骨远端中降低了平均 41%和 49%，在脊椎中降低了 40%和 41%。与对照相比，在 OVX 组的股骨中，胃石和 ACC 分别呈现显著高平均 65%和 49%的小梁骨比例和小梁骨数量。在胃石和 ACC 组的腰椎中也获得了类似的结果，与对照相比，分别高平均 48%和 47%。在柠檬酸盐和对照之间没有观察到小梁骨比例和其数量方面的显著差异。

[0585] 在胃石和 ACC 组的股骨之间的比较揭示，在骨比例、小梁骨厚度和小梁骨间距方面的显著差异。根据图 9A 和表 21A 中呈现的结果，与 ACC 相比，胃石组的股骨显示显著高 16%的骨比例，高 9%的小梁骨厚度和低 24%的小梁骨间距。与 ACC 相比，在胃石的脊椎中还观察到了显著高 12%的小梁骨厚度，但在胃石和 ACC 之间的形态测定参数的剩余部分没有观察到显著差异（图 9B 和表 21B）。

[0586] 各组之间在微结构方面的差异还着重在表 22A 呈现的近端胫骨的未脱钙结构组织形态测定分析中。根据表 22A 呈现的结果，与假处理相比，所有 OVX 组，即对照、胃石、ACC 和柠檬酸盐呈现显著更低的小梁骨比例和缩小的小梁骨值（分别平均 55%、19%、32%和 55%）。此外，与假处理相比，小梁骨间距在所有 OVX 组中显著较高，对照高 130%、胃石高 30%、ACC 高 60%和柠檬酸盐高 148%（表 22A）。与对照相比，在 OVX 组内，胃石和 ACC 分别呈现显著高平均 80%和 50%的小梁骨比例和小梁骨数量，且低 44%和 31%的小梁骨间距。与对照相比，柠檬酸盐组呈现显著高 13%的小梁骨厚度。在胃石和 ACC 组之间的结构组织形态学参数的比较揭示在骨比例、小梁骨数量和小梁骨间距方面的显著差异。根据表 22A，与 ACC 相比，胃石组分别呈现高 19%和 21%的骨比例和小梁骨数量，且与 ACC 相比，低 20%的小梁骨间距值。

[0587] 表 22：来自胫骨近端的未脱钙的切片的组织形态测定分析

[0588]

			OVX			
		假处理	对照	胃石	ACC	柠檬酸盐
(A) 结构	**BV/TV, %	28.5[a] (4.1)	12.8[b] (2.1)	23[c] (3.3)	19.4[d] (2.8)	12.8[b] (1.4)
	**Tb. N, mm^{-1}	5.6[a]	2.5[b]	4.5[c]	3.7[d]	2.3[b]

[0589]

		(0.6)	(0.5)	(0.4)	(0.8)	(0.3)
	**Tb. Sp, μm	128[a] (25)	296[b] (44)	166[c] (15)	205[d] (43)	318[b] (42)
	*Tb. Th, μm	51.2[ab] (6.2)	47.1[a] (6.0)	51.6[ab] (7.1)	54.8[b] (7.7)	53[b] (9.9)
(B) 动态	**BFR/BS, $\mu m^2/\mu m/$天	0.145[a] (0.026)	0.164[a] (0.021)	0.214[b] (0.025)	0.206[b] (0.027)	0.159[a] (0.019)
	**MS/BS, %	8.04[a] (1.53)	8.31[a] (1.42)	11.61[b] (1.36)	11.09[b] (1.18)	8.25[a] (1.44)
	MAR, μm/天	1.26 (0.26)	1.30 (0.19)	1.34 (0.25)	1.29 (0.21)	1.40 (0.20)

[0590] (A)从4μm染色的切片(MacNeal)分析结构参数。(B)从用钙黄绿素荧光染料双标记的未脱钙的切片分析动态参数。使用BIOQUANT图像分析软件(Bioquant OSTEO,版本7.20.10)计算所有的值。单因素ANOVA:*$p<0.05$,**$p<0.01$。字母代表Fisher-LSD事后比较检验。

[0591] 动态组织形态测定分析的结果列于表22B中。根据结果,与假处理相比,在OVX对照组和柠檬酸盐组的向骨表面的骨形成率(bone formation rate to bone surface,BFR/BS)和向骨表面矿化表面(mineralizing surface to bone surface,MS/BS)方面没有观察到显著差异。在另一方面,与假处理相比,OVX胃石和ACC的骨形成率高53%和50%,且与假处理相比,OVX胃石和ACC的MS/BS分别呈现44%和38%的相似升高。与对照相比,在OVX组内,胃石和ACC分别呈现显著高38%和35%的骨形成率,和显著高40%和33%的MS/BS。OVX柠檬酸盐组与对照没有呈现显著不同,但来自胃石的28%的和来自ACC的26%的统计学上较低的骨形成率。OVX柠檬酸盐组的MS/BS与对照的MS/BS相似,且比胃石组和ACC组的分别显著低29%和26%。

[0592] 矿物质沉积率(MAR)揭示,与假处理相比,在所有OVX组中无显著差异,且与对照相比,OVX胃石、ACC和柠檬酸盐的无差异。表23呈现了,EIA试剂盒在实验结束时(第90天)由每组的血清骨钙素(OC)形成标志物和尿脱氧吡啶啉(DPD)再吸收标志物评估骨转换。评价了两种标志物的基线,随后随机化(在第0天,数据未显示)。

[0593] 表23:在第90天时评估每个组的血清骨钙素(OC)形成标志物和尿脱氧吡啶啉(DPD)再吸收标志物

[0594]

	假处理	OVX			
		对照	胃石	ACC	柠檬酸盐
*DPD (nmol/mmol Cr)	13.75[a] (5.44)	36.65[be] (31.16)	29.823[bd] (16.56)	22.59[ad] (11.09)	43.55[e] (22.97)
OC (ng/ml)	10.0[a] (4.8)	14.8[a] (6.4)	14.72[a] (8.7)	12.7[a] (6.8)	15.7[a] (8.4)

[0595] 单因素 ANOVA :*p<0.05。

[0596] 在第 90 天时，与假处理相比，在所有 OVX 组中观察到显著较高的 DPD 水平，ACC 组除外，ACC 组呈现与假处理无显著差异，且与对照组 (39％)、和柠檬酸盐组 (48％) 相比显著较低的 DPD 水平。胃石组与对照相比呈现较低的水平 (19％)，且与 ACC 组相比较高的水平 (32％)。来自胃石的 DPD 水平不比柠檬酸盐统计上低，但呈现 31％的差异。在血清 OC 标志物方面，在任何组之间没有观察到显著变化。

[0597] 来自第五腰椎的机械强度分析的结果示于图 10。根据结果，与假处理相比，OVX 对照、胃石和柠檬酸盐的机械强度性质分别显著降低了平均 41％、40％和 40％。然而，与假处理相比，ACC 组的机械强度值显著降低了平均 17％。这些差异在评估的大多数参数上是统计学显著的，除了极限承载力参数无统计学差异 (图 10D)。与对照相比，在 OVX 组内，ACC 组在每个测试的参数中呈现显著更高的值 :极限承载力 (图 10A)、极限承载力的能量 (图 10B)、韧性 (图 10C) 和屈服能量 (图 10D) 分别高平均 37％、49％、29％和 65％。这些差异还反映在 OVX ACC 与胃石和柠檬酸盐组相比的较高值中，分别高平均 42％和 37％。OVX 胃石和柠檬酸盐组与对照或其之间在测试的任何机械强度参数方面没有呈现任何统计学差异。

[0598] 第 4 腰椎的显微 CT 分析显示，小梁骨模式因子 (TBPf) 在假处理组比在 OVX- 对照、OVX- 胃石和 OVX- 柠檬酸盐组低得多 (平均 91％)。然而，假处理组的 TBPf 比对 OVX-ACC 组测量的 TBPf 低 (61％)。在 OVX 组内，OVX-ACC 组的 TBPf 比 OVX- 对照、OVX- 柠檬酸盐和 OVX- 胃石组的 TBPf 显著低平均 33％ (图 10E ;p<0.001)。结构模型指数 (SMI) 评估指出相同趋势，与 OVX- 对照、OVX- 胃石和 OVX- 柠檬酸盐组相比，在假处理组中显著降低 (平均 43％)。然而，假处理组的 SMI 比对 OVX-ACC 组测量的 SMI 更低 (30％)。此处，对 OVX-ACC 组获得的值比对 OVX- 对照和 OVX- 柠檬酸盐组测量的值显著更低 (平均 14％)。同时，对 OVX-ACC 组获得的 SMI 值相对于对 OVX- 胃石组测量的指数减少了 (图 10F ;P<0.001)。与 OVX- 对照、OVX- 胃石和 OVX- 柠檬酸盐组相比，测量的最后一个微结构参数，即各向异性度 (DA)，在假处理组中降低了平均 22％。在假处理和 OVX-ACC 组之间，或所有 OVX 组之间没有观察到 DA 的显著差异，虽然 OVX-ACC 显示比对其他 OVX 组测量的低的值 (图 10G ; P<0.001)。

[0599] 实验细节

[0600] 动物

[0601] 将具有 250±16g 的平均体重的一百零一只 16-17 周龄雌性 Sprague Dawley 大鼠 (Harlan Inc.,Jerusalem,Israel) 群养在 33 个笼子里 (～ 3 只大鼠 / 笼子)，并在控制室内条件 (21±2℃和 12- 小时暗 - 光周期) 下适应。在 7 天适应期间，大鼠饲以包含 1％元素钙的标准实验室饮食 (#2018SC 大鼠饲料，Harlan Inc.Jerusalem,Israel) 和自由采食去离子水。7 天适应阶段后，将大鼠在代谢笼中单独饲养，并剥夺食物和水 18h。从各代谢漏斗收集尿，并保存在 -80℃用于未来分析在基线时 (时间 0) 骨再吸收生化标志物。

[0602] 对于施用不同钙源，制备包含特殊的食物颗粒。包含 0.02％钙的低钙啮齿类粒料 (大鼠饲料 #TD95027 Harlan Inc.,Jerusalem,Israel) 被精细地磨碎，并分别与四种不同的钙源混合。对照混合物包含来自商品化补充剂的碳酸钙 (混合物 A)，胃石混合物包含从澳大利亚螯虾红螯螯虾收获的胃石粉 (混合物 B)(Ben's farm,Beer

Tzofar,Israel)，ACC 混合物包含稳定的无定形碳酸钙和 P- 丝氨酸 (P-Ser)(混合物 C)(Batch#ETS001,Amorphical Ltd.,Beer-Sheva,Israel) 和柠檬酸盐混合物包含来自商品化补充剂的柠檬酸钙 (混合物 D)。每一混合物分别制粒并室温下保持在密封袋中。

[0603] 在尿液取样后立即，大鼠使用腹腔内 (IP) 注射包含氯胺酮 (Fort Dodge AH Ltd.Overland Park,USA) 和甲苯噻嗪 (EuroVet AH Ltd.Bladel,UK) 的麻醉剂溶液 (0.1ml/100g) 来麻醉。从大鼠的尾部抽取血液 (大约 180μl) 并使用台式离心机 (Hettich Zentrifugen,Bach,Switzerland) 以 3000g 离心 10 分钟用于血清提取。血清样品储存在 -80℃下用于未来分析在基线时 (时间 0) 骨形成的生化标志物。

[0604] 将大鼠随机分配并根据其分配的五组操作 :假处理 (假处理 - 卵巢切除的) 用混合物 A 喂食，且其他四组使用根据 Lasota 和 Danowska-Klonowska(2004)Rocz Akad Med Bialymst 49 Suppl 1:129-131 的双侧背侧方法来切除卵巢 (OVX)，并分为 OVX 对照 (用混合物 A 喂食)、OVX 胃石 (用混合物 B 喂食)、OVX ACC(用混合物 C 喂食) 和 OVX 柠檬酸盐 (用混合物 D 喂食)。操作后，在与适应阶段相同的条件下对大鼠提供 7 天恢复期，自由采食标准实验室饮食和包含 1.5ml/400ml 安乃近 (Vitamed Ltd.,Binyamina,Israel) 和 1mg/kg 恩氟沙星 (Buyer Ltd.Leverkusen,Germany) 的去离子水。

[0605] 实验处理

[0606] 在恢复期结束时，将大鼠根据组的分配，在如上述相同的控制室内条件下群养在 47 只笼子中 (2 只大鼠 / 笼)。在整个处理期间 (90 天) 提供自由采食的分配的补充剂颗粒和去离子水。每周记录食物摄入和体重 (表 2)。对于动态组织形态学分析，荧光染料钙黄绿素 (20mg/kg 体重，Sigma-Aldrich,Israel) 在第 76 和 86 天时 IP 注射至所有大鼠。第 90 天时，将大鼠在代谢笼中单独饲养，并剥夺食物和水 18h。从各代谢漏斗收集尿，并保存在 -80℃用于未来在试验结束 (时间 90) 时分析骨再吸收生化标志物。在尿取样后立即，提取血清样品用于评价第 90 天的形成生化标志物并以如在第 0 天时描述的相同方式保存。通过 CO_2 处死所有大鼠。将右股骨和第 4 腰椎切下，包裹上浸有生理盐水缓冲液的纱布垫，并保存在 -80℃用于测量骨显微 CT 扫描。将第五腰椎储存在与右股骨相同的条件下用于机械测试。将右胫骨解剖并立即放置在 4℃下 3.7％甲醛溶液 (F1636,Sigma-Aldrich,Israel) 中 24h 用于结构和动态组织形态学测量。

[0607] 微型计算机断层扫描 (μCT) 扫描

[0608] 右股骨和第 4 腰椎的小梁骨和皮质骨微结构使用 μCT 扫描仪 (Skyscan1174,Kartuizersweg Kontich,Belgium) 进行分析。扫描仪对于骨矿物质密度 (BMD) 的校准根据制造商说明书使用具有 0.25 和 0.75g/cm^3 密度的指定的大鼠模型杆 (Skyscan,Kartuizersweg Kontich,Belgium) 进行。

[0609] 扫描分析之前，将股骨和第 4 腰椎从 -80℃中取出，转移至用 70％乙醇浸泡的新纱布垫中，并放置在装有 70％乙醇的塑料瓶中 (根据制造商指导)。每个股骨的远端区域以 13.8μm 的各向同性分辨率扫描小梁骨和皮质骨参数。使用 Skyscan Nrecon 软件 (版本 1.6.4,Skyscan) 应用改进的算法进行重建。将感兴趣的体积 (VOI) 设置到生长板下 0.5mm，并远端延伸 1.5mm。在 VOI 内的小梁骨和皮质段，使用扫描仪配有的 CTan 分析软件 (版本 1.11 Skyscan)，通过每～ 5 片描绘椭圆形轮廓来提取。小梁骨和皮质 BMD、骨体积 (BV/TV，％)、小梁骨数量 (Tb.N)、小梁骨厚度 (Tb.Th，μm)、小梁骨间距 (Tb.Sp，μm) 由 CTan

分析仪软件（版本 1.11 Skyscan）自动计算。

[0610] 来自每只大鼠的第 4 腰椎以 13.8μm 各向同性分辨率进行扫描且将 VOI 设置为覆盖从椎体的中心的 2.0mm 厚横截面。在椎体中评价小梁骨和皮质骨参数，设置覆盖 2-mm 厚横截面的 VOI，在颅生长板下 0.14mm 开始。除了对股骨远端研究的相同的小梁骨和皮质骨参数外，还在椎体中测量了拓扑学参数：即小梁骨模式因子（TBPf）和结构模型指数（SMI）；和小梁取向参数，各向异性度（DA）。

[0611] 组织形态测定

[0612] 将右胫骨从甲醛溶液中取出，并通过乙醇梯度脱水，使用二甲苯（24250521,Bio-Lab Ltd.Haifa,Israel）清洁，并用 80％甲基丙烯酸甲酯（MMA；M5599,Sigma Aldrich,Rehovot,Israel）+20％邻苯二甲酸二丁酯（DBP；61-5062,Merck Ltd.,Hohenbrunn,Germany）在 4℃下渗透 3 天。然后将标本转移至 MMA+DBP+ 过氧化苯甲酰（617008,Merck Ltd,Hohenbrunn,Germany）溶液中在 4℃下渗透另外 6 天。渗透过程后，将标本在温度梯度（从 38℃至 50℃历时 4 天）下包埋在 MMA+DBP+2.5％过氧化苯甲酰中。使用与碳化钨刀（Disposable blade；TC65,Rhenium Inc.Bet-Nekufa,Israel）连接的 Lecia RM 2025 切片机（Lecia Instruments Ltd,Petach Tikva,Israel），从每个样品切割正中矢状（4μm）未脱钙切片。大部分切片用 McNeal’s tetrachrome 染色用于结构组织形态测定。其余切片保留未染色用于动态组织形态测定。

[0613] 使用与配备荧光光源的显微镜（Nikon Optiphot 2,Kingston,England）连接的半自动分析系统（Bioquant OSTEO，版本 7.20.10,BIOQUANT Image Analysis Corporation Nashville,USA）获得胫骨近端干骺端的结构和动态组织形态测定两者的测量。

[0614] 组织形态学参数诸如骨体积（BV/TV，％）、小梁骨数量（Tb.N）、小梁骨厚度（Tb.Th，μm）、小梁骨间距（Tb.Sp，μm）、骨形成率 / 骨样品（BFR/BS）、矿化表面 / 骨表面（MS/BS）和矿物质沉积率（MAR）使用 BIOQUANT 图像分析软件（Bioquant OSTEO，版本 7.20.10）来计算。

[0615] 评价骨转换生化标志物

[0616] 血清骨钙素（OC）浓度由 EIA 试剂盒（#BT-490,Biomedical Technologies Inc.Stoughtone,USA）按照 1:10 血清稀释来确定。

[0617] 尿脱氧吡啶啉（DPD）浓度由商品化 EIA 试剂盒（#8007,Qudiel Inc.San Diego,USA）按照 1:50 稀释来确定。将 DPD 水平对肌酸酐水平标准化（#8009,Qudiel Inc.San Diego,USA）。

[0618] 第 5 腰椎的机械强度

[0619] 机械性质（极限承载力、极限承载力的能量、韧性和屈服能量）获自第 5 腰椎体（L5）的耐压试验。通过使用卡尺测量椎体高度和尾径和颅径的平均值进行材料性质的计算。横截面面积（CSA）和骨体积（BV）通过 μCT 扫描所覆盖的包括小梁骨和皮质壳两者的整个骨来获得。

[0620] 统计分析

[0621] 结果在本文中表示为平均值 ±SEM。使用 STATISTICA6.1 软件（StaSoft,Tulsa,OK）进行单因素 ANOVA 和 Fisher-LSD 事后比较检验。p 值 <0.05 被认为是显著。

[0622] 上述试验的结果证实，在易发生骨质疏松症的研究组中，稳定的ACC比CCC对骨矿物质密度和其他骨参数具有更高的效应。ACC的优良生物利用度允许其用于阻止或延缓代谢性骨紊乱、疾病和状况的发作的用途。

[0623] 虽然本发明的实施方案通过举例的方式已被描述，但应理解，本发明可以进行许多变化、修改和改编，并不超出权利要求书的范围。

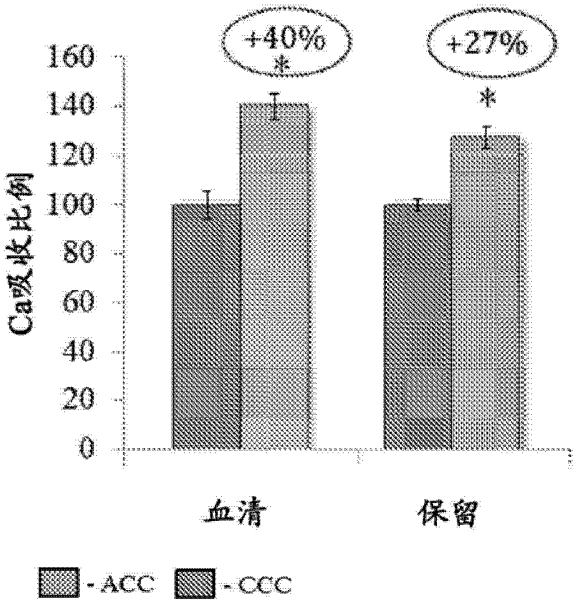

+40%
*
+27%
*
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Ca吸收比例
血清
保留
- ACC
- CCC

图 1

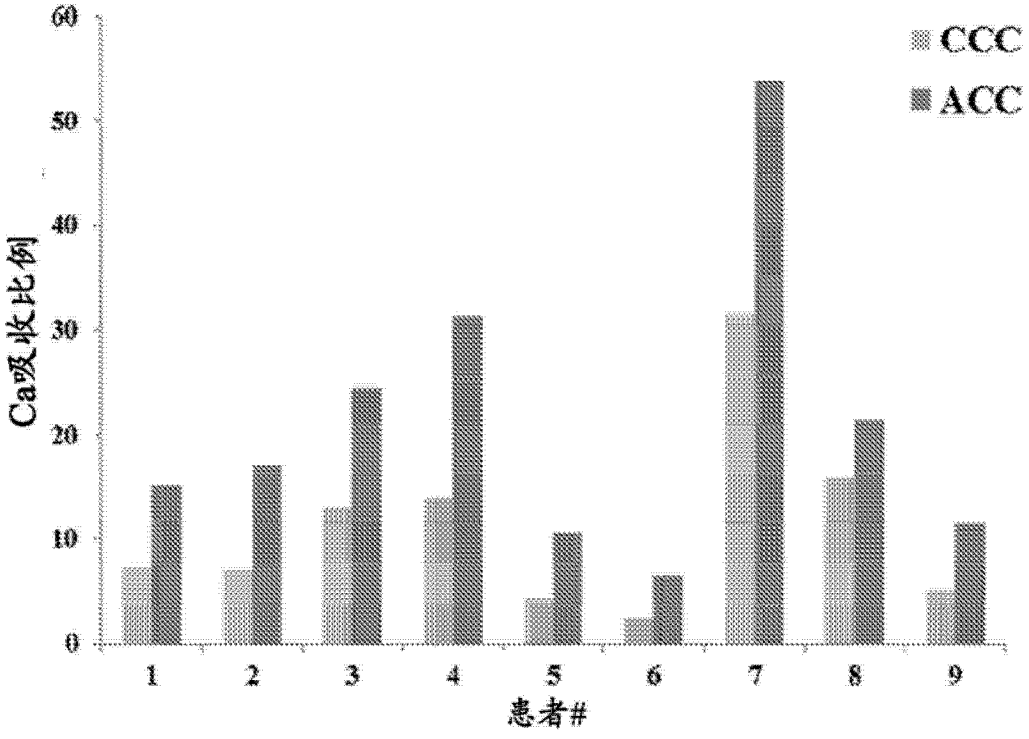

60
50
40
30
20
10
0
Ca吸收比例
CCC
ACC
1
2
3
4
5
6
7
8
9
患者#

图 2

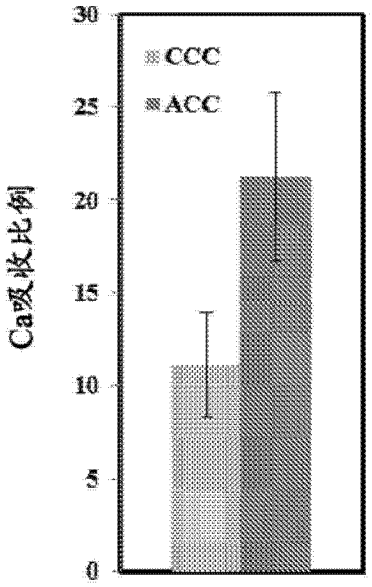


图 3

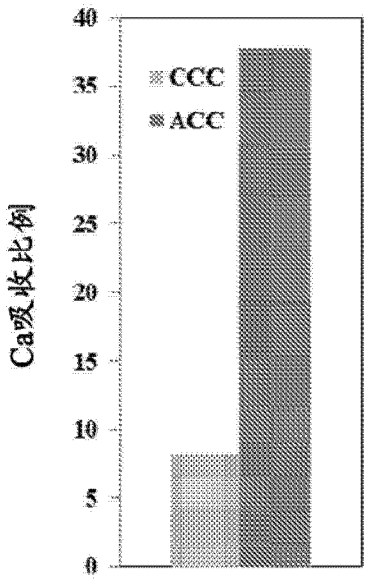


图 4

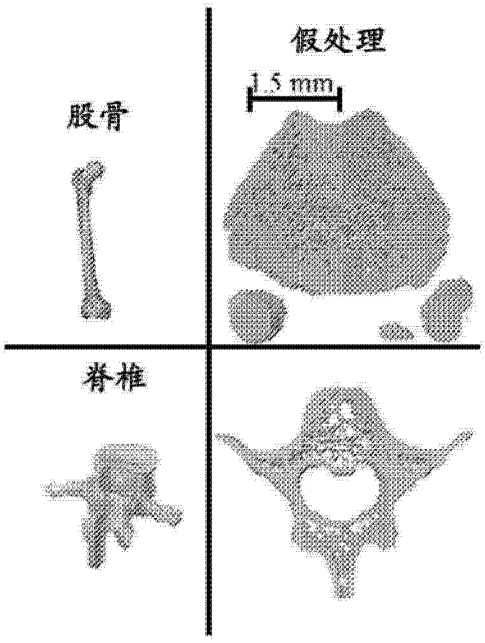


图 5A

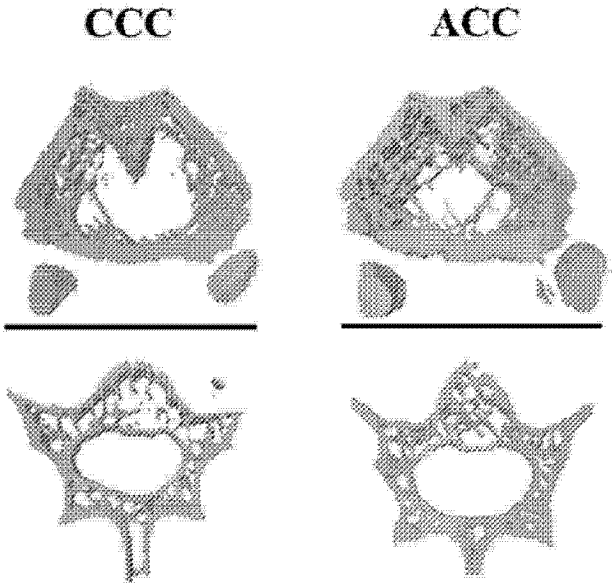


图 5B

图 5C

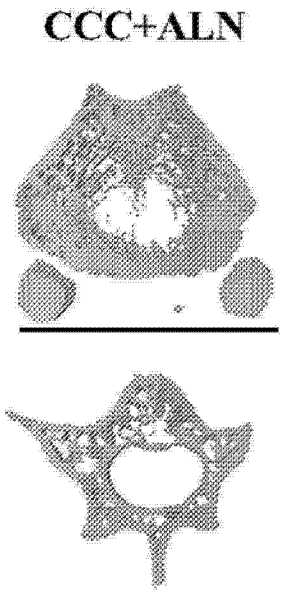

CCC+ALN

图 5D

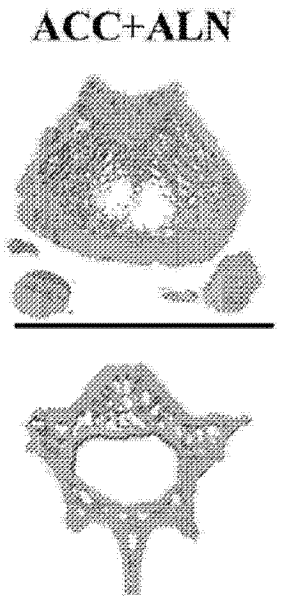

ACC+ALN

图 5E

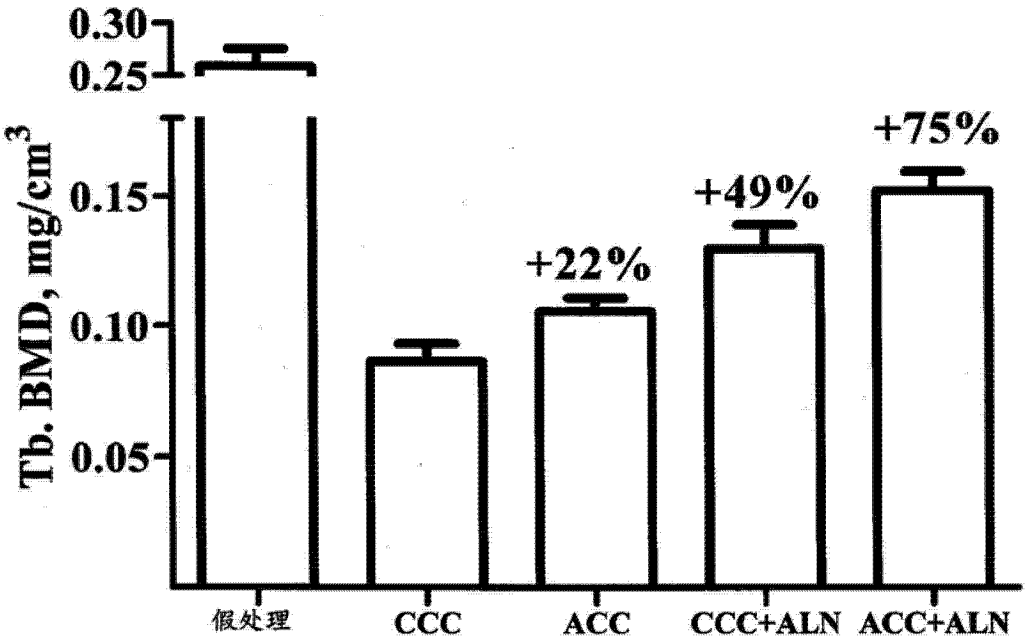

0.30
0.25
0.15
0.10
0.05
Tb. BMD, mg/cm3
+22%
+49%
+75%
假处理
CCC
ACC
CCC+ALN
ACC+ALN

图 6A

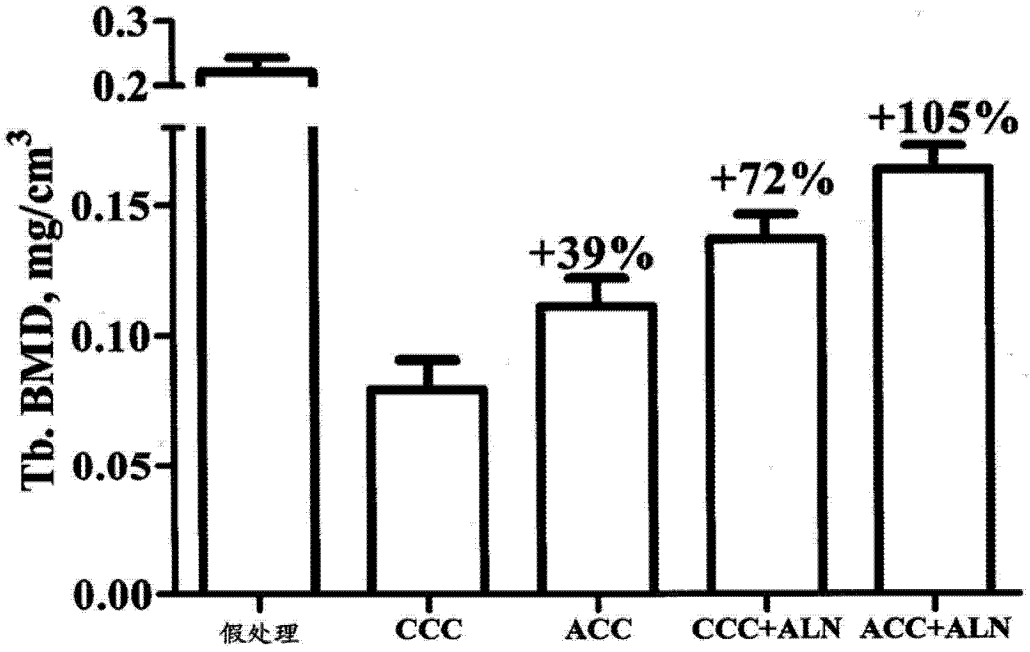

0.3
0.2
0.15
0.10
0.05
0.00
Tb. BMD, mg/cm3
+39%
+72%
+105%
假处理
CCC
ACC
CCC+ALN
ACC+ALN

图 6B

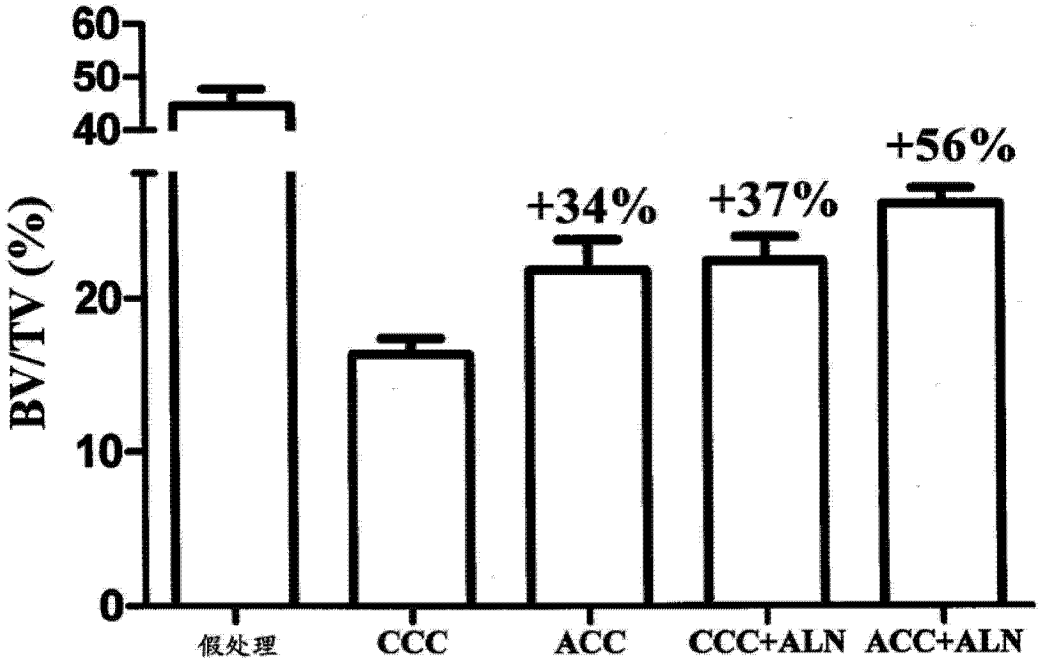

60
50
40
20
10
0
BV/TV (%)
+34%
+37%
+56%
假处理
CCC
ACC
CCC+ALN
ACC+ALN

图 6C

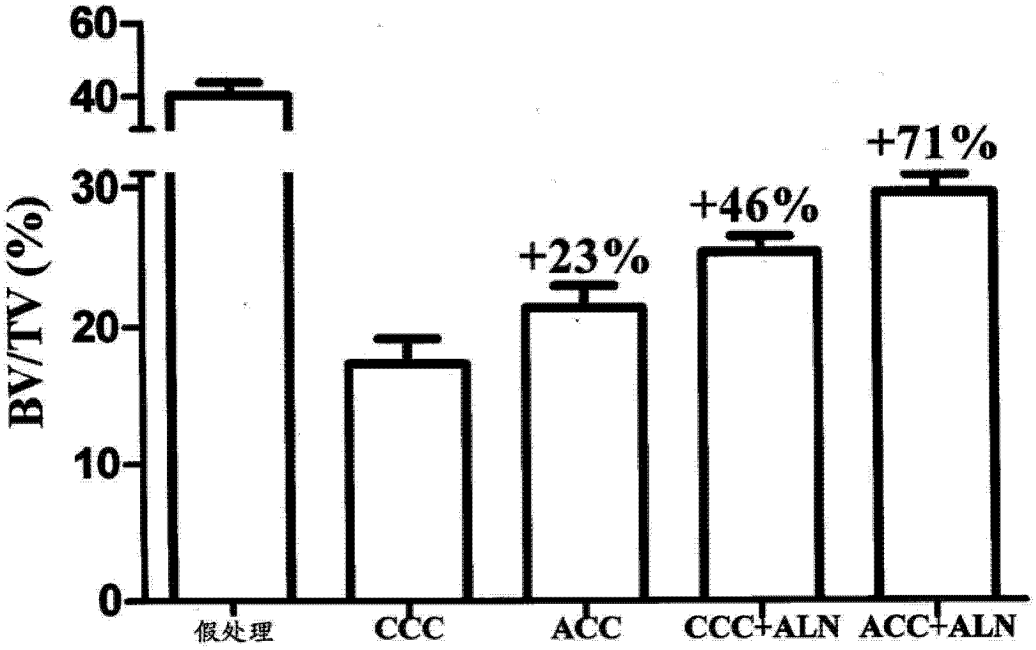


图 6D

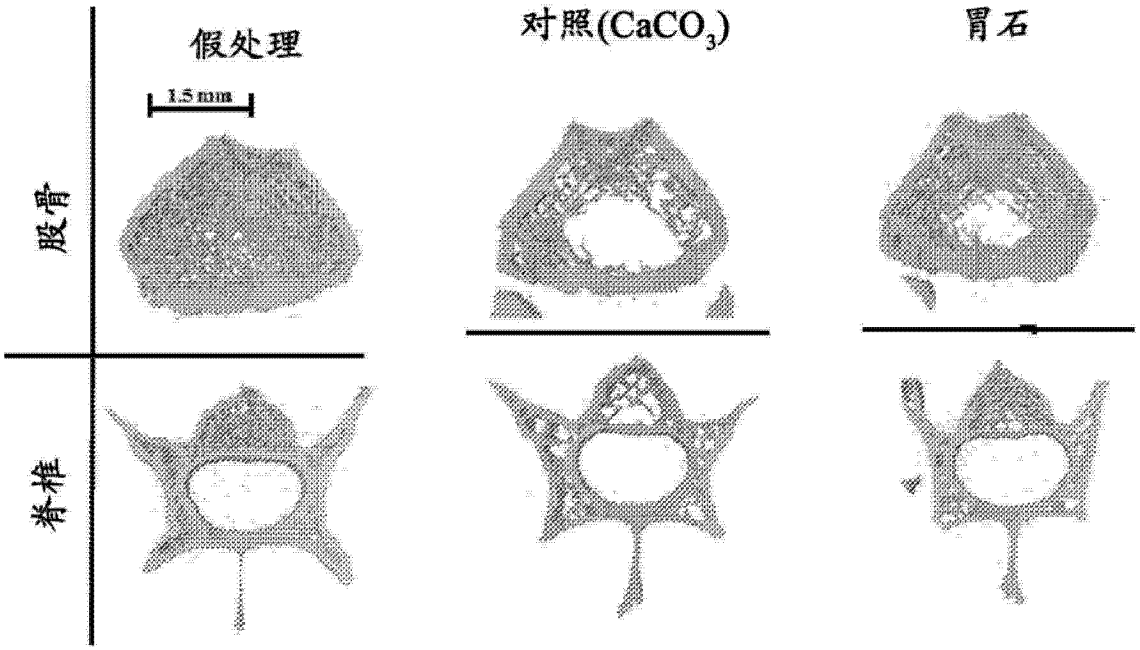


图 7A

图 7B

图 7C

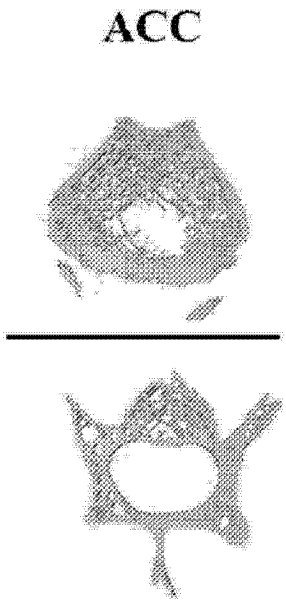

ACC

图 7D

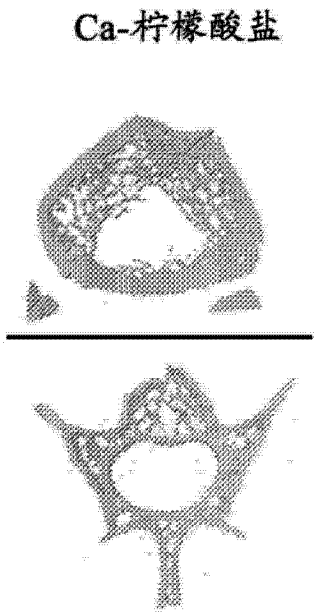

Ca-柠檬酸盐

图 7E

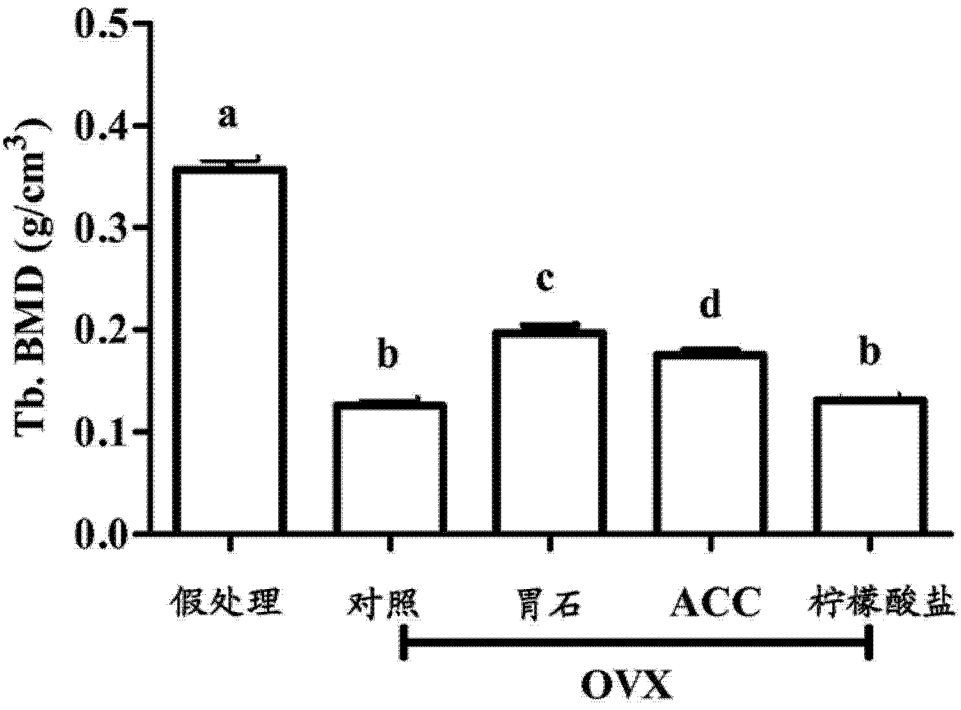

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Tb. BMD (g/cm3)
a
b
c
d
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图 8A

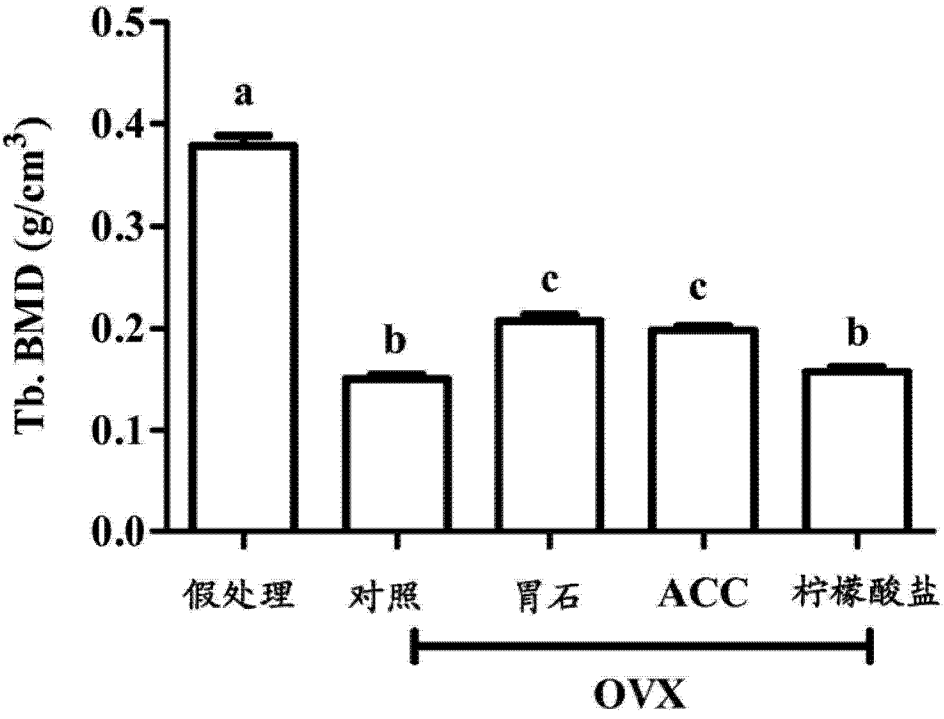

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Tb. BMD (g/cm3)
a
b
c
c
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图 8B

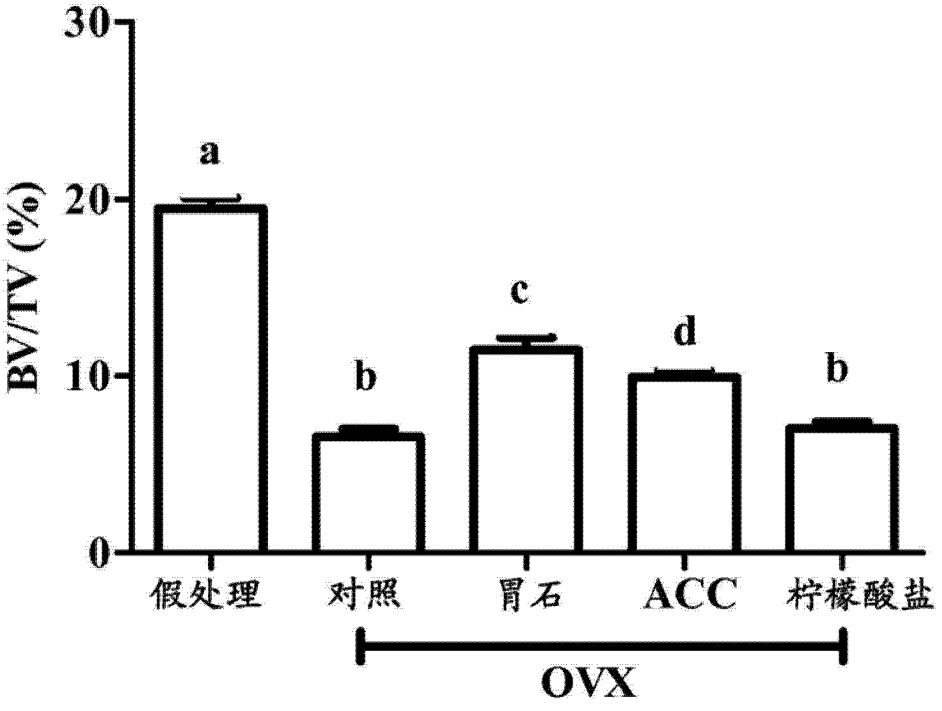

30
20
10
0
BV/TV (%)
a
b
c
d
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图 9A

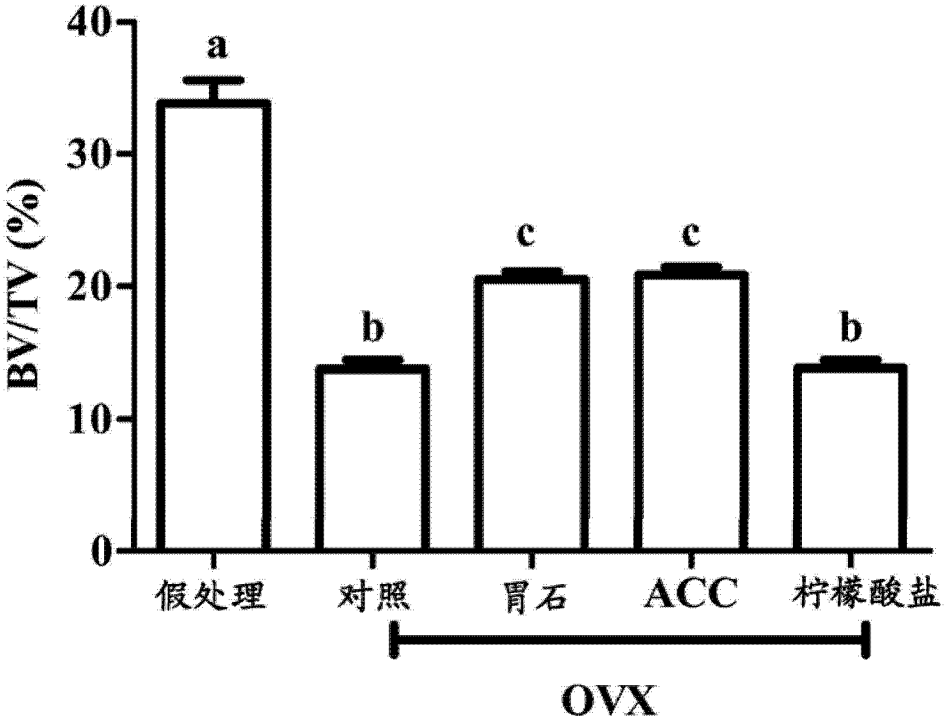

40
30
20
10
0
BV/TV (%)
a
b
c
c
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图 9B

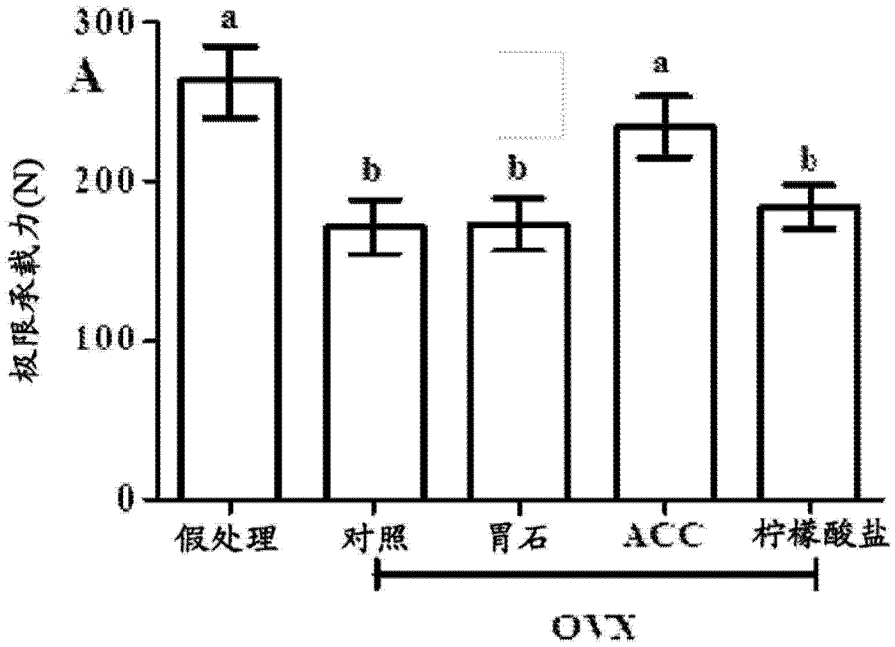

300
200
100
0
A
极限承载力(N)
a
b
b
a
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图 10A

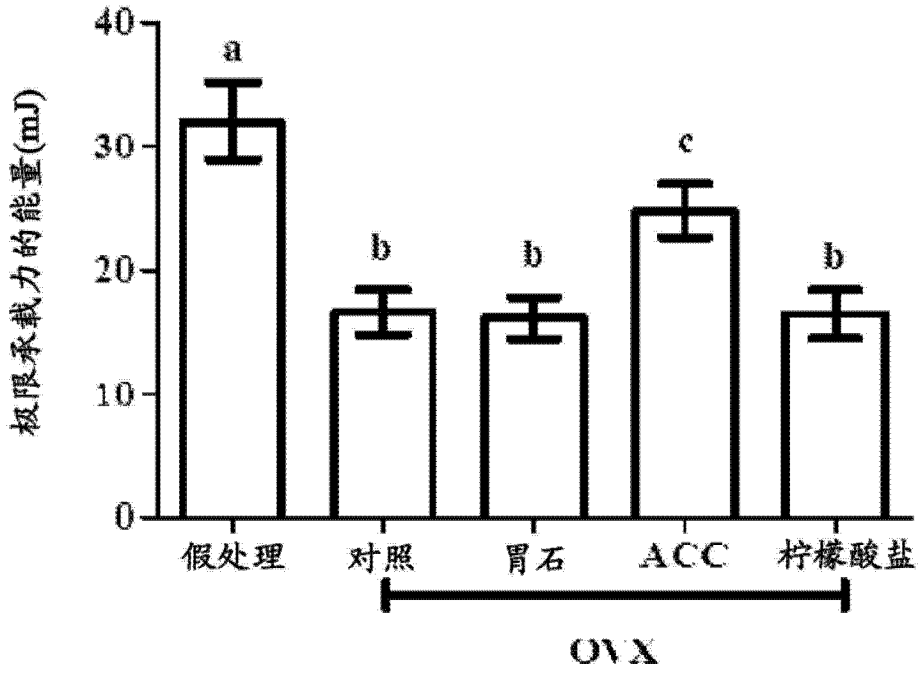

极限承载力的能量(mJ)
40
30
20
10
0
a
b
b
c
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图 10B

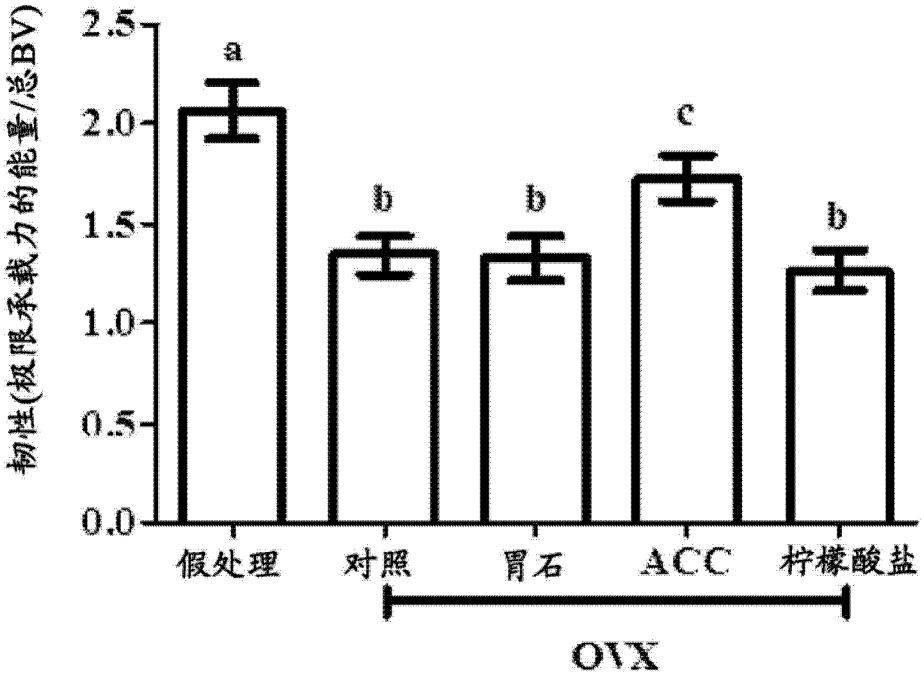

韧性(极限承载力的能量/总BV)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
b
c
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图 10C

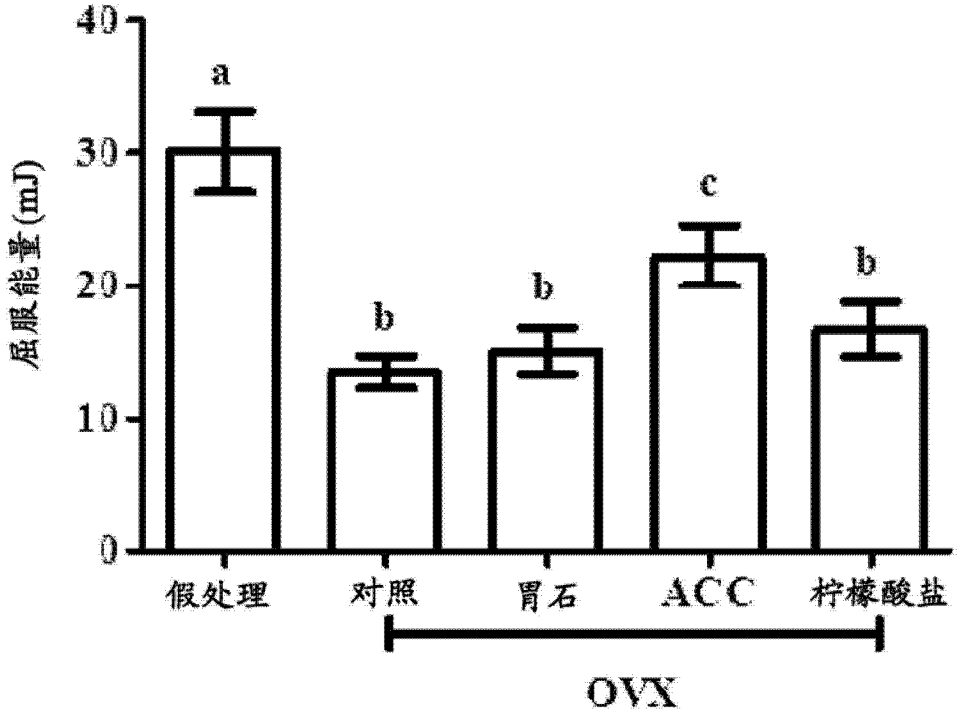

40
30
20
10
0
屈服能量(mJ)
a
b
b
c
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图 10D

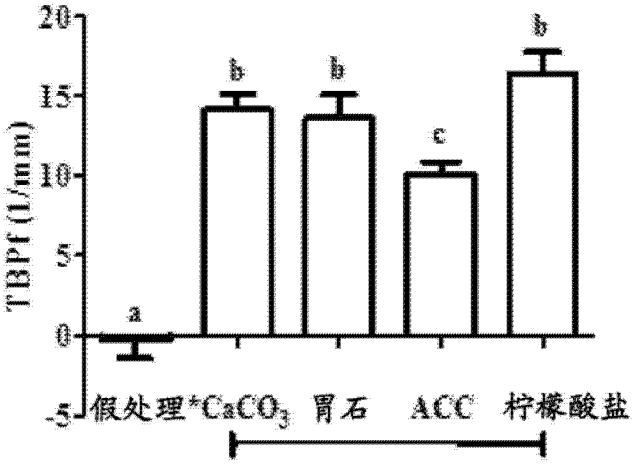

20
15
10
5
0
-5
TBPf (L/mm)
a
b
b
c
b
假处理
*CaCO3
胃石
ACC
柠檬酸盐

图 10E

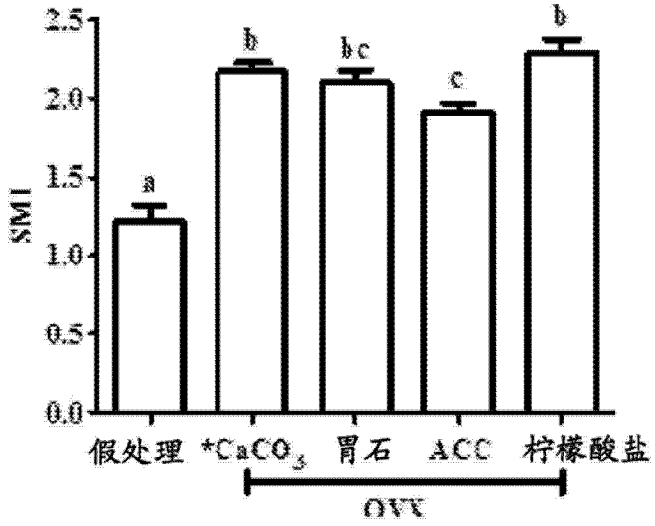

SMI
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
bc
c
b
假处理
*CaCO3
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图 10F

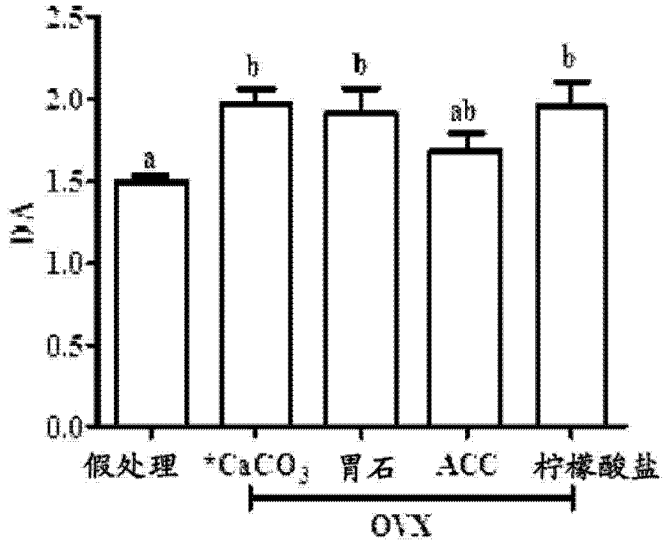

DA
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
b
ab
b
假处理
*CaCO3
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图 10G